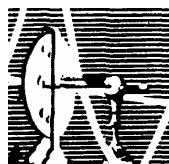


EDUARDO BOUTH SEQUERRA

“Expressão de GABA e plasticidade do fenótipo
neuroquímico e morfológico de células da Zona
Subventricular pós-natal”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2 0 0 8

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SEQUERRA, Eduardo B.

Expressão de GABA e plasticidade do fenótipo neuroquímico e morfológico de células da Zona Subventricular pós-natal

Eduardo Bouth Sequerra – Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2008

xiv, 130f.:il.

Orientador: Cecilia Hedin Pereira

Tese (Doutorado) – UFRJ/IBCCF/Programa e Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica)

Referências Bibliográficas: f. 83-125

1. Zona Subventricular

2. GABA

3. Putrescina

4. Neurônio glutamatérgico

II. Univeridade Federal do Rio de Janeiro

III. Título

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroanatomia Celular do Departamento de Anatomia da UFRJ nos Laboratórios de Neuroquímica e Neurobiologia da Retina do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, RJ – Brasil – sob a orientação da Dra. Cecilia Hedin Pereira e colaboração da Dra. Patrícia França Gardino e do Dr. Fernando Garcia de Mello e na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Nosso grupo agradece o Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a saúde – PDTIS – FIOCRUZ pelo uso de seu confocal de varredura a Laser LSM-510.

À memória de Michele de Oliveira Macedo.

Ao nosso amor e a nossa força.

Agradecimentos:

- À professora Cecilia Hedin Pereira, pela orientação, dedicação, amizade e carinho.
Por ter agüentado minha teimosia e estimulado meus devaneios.
- Ao professor João Ricardo Lacerda de Menezes, pela revisão da tese, pelas críticas ao artigo, pela discussão à distância do projeto, pela amizade e pelas piadas que tornam o laboratório um lugar bem mais agradável.
- À professora Maira Monteiro Fróes, pelo lampejo que originou o projeto, pelas discussões dos dados, pelo estímulo e pela amizade.
- Aos professores Patrícia França Gardino e Fernando Garcia de Mello, por terem aceitado desenvolver a colaboração, pelo entusiasmo e pela amizade.
- Ao bioterista Adiel do Nascimento, pelo cuidado e carinho com os animais. Grande amigo.
- Às técnicas de laboratório Carla Moreira Furtado e Rosilane Taveira da Silva, por terem feito a minha vida muito mais fácil. Obrigado pelo carinho.
- À Elizabeth de Moraes, por todo o carinho e atenção.
- Aos amigos do Laboratório de Neuroanatomia Celular, pelo companheirismo, amizade e compreensão.
- Aos amigos dos Laboratórios de Neuroquímica e Neurobiologia da Retina, por terem me ajudado e feito minha adaptação ser muito fácil.
- Ao professor Ricardo Iglesias Rios, pelas discussões sobre epigenética.

- Aos meus amigos da Neurociência, Danilo, Felipe, Fabi, Patrícia, Leo, Suzaninha, Jean e muitos outros, pelo companheirismo e pelas discussões com cerveja.
- Aos meus amigos e família, por torcerem sempre por mim e me apoiarem nos momentos difíceis.
- À Michele de Olivera Macedo, pelo amor, pelo carinho, pelo apoio e por ter feito de mim um cara mais forte.

Sumário

Lista de abreviaturas	x
Resumo	xiii
Abstract	xiv

1-Introdução

1.1-Apresentação do problema experimental	1
1.2- Zona Subventricular, Zona Subependimária e Via Migratória Rostral: Problemas Terminológicos	3
1.3- Especialização progressiva da camada proliferativa embrionária	8
1.4- Origem da SVZ e transição para a idade adulta	10
1.5- Diversidade dos neurônios renováveis do BO	16
1.6- GABA e os neuroblastos da SVZ	22

2-Objetivos

2.2- Objetivo Geral	25
2.3-Objetivos específicos	25

3-Materiais e Métodos

3.1-Ensaio de conversão de putrescina em GABA	26
3.2- Atividade da decarboxilase da ornitina (ODC)	28
3.3- Inibição in vivo da síntese de putrescina	28
3.4- Dosagem de putrescina no cerebelo	29
3.5- Análise do efeito da diminuição dos níveis de putrescina sobre a proliferação da SVZ	30
3.6- Cultura de explantes de SVZ pós-natal	31

3.7- Ensaio sobre a plasticidade fenotípica de células da SVZ_____	32
3.8- Procedimentos para a preparação de co-culturas de fatias organotípicas e explantes de SVZ de animais transgênicos para eGFP _____	33
3.9- Imuno-histoquímica das coculturas de telencéfalo embrionário e explantes de SVZ pós-natal_____	36
3.10- Análise e edição de imagens_____	37
4-Resultados	
4.1-Via de síntese de GABA pelas células da SVZ_____	38
4.2-Células da SVZ sintetizam GABA a partir de putrescina_____	43
4.3- Identificação da fonte de putrescina da SVZ_____	44
4.4-Papel do GABA de putrescina na biologia das células da SVZ_____	45
4.5- Efeito subregulação da putrescina sobre a proliferação na SVZ _____	46
4.6-Expressão de GABA e GAD na SVZ de animais no modelo de diminuição da putrescina _____	46
4.7- GABA regula migração de neuroblastos a partir de explantes cultivados____	51
4.8- Células da SVZ pós-natal invadem córtex cerebral embrionário de roedores_____	52
4.9- Neurotransmissores expressos por células da SVZ pós-natal transplantadas para o córtex embrionário_____	54
5-Discussão	
5.1-Neuroblastos da SVZ sintetizam GABA a partir de putrescina_____	60
5.2- O código epigenético e reformulações conceituais sobre a diferenciação celular_____	64
5.3- Plasticidade de progenitores da SVZ quanto ao seu destino neuroquímico____	73

5.4- Hipótese de trabalho_____	80
6- Referências Bibliográficas_____	83
7-Artigo: Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone_____	125

Lista de abreviaturas:

Ara-C- citosina- β -D-arabinofuranosídeo

BDNF- fator neurotrófico derivado de encéfalo (do inglês, brain derived neurotrophic factor)

bHLH- classe de fatores de transcrição, hélice-volta-hélice básico (do inglês, basic helix-loop-helix)

BO- bulbo olfatório

BrdU- Bromo 2-deoxi 5 uridina

DCX- proteína de citoesqueleto ligada á migração de progenitores neurais (do inglês, doublecortin)

DFMO- di-fluor-metil-ornitina

DIV- dias *in vitro*

Dlx- fator de transcrição (do inglês, distal-less homeobox)

DMEM- meio de cultura de células (do inglês, Dulbecco's modified Eagle's medium)

DNA- ácido deoxi-ribonucléico (do inglês, deoxiribonucleic acid)

EDTA- ácido etilenodiamina-tetra-acético

EG- eminência ganglionar

EGL- eminência ganglionar lateral

Emx1- fator de transcrição (do inglês, empty spiracles homolog 1)

EPL- camada plexiforme externa (do inglês, external plexiform layer)

FGF2- fator de crescimento de fibroblastos 2 (do inglês, fibroblast growth factor 2)

GABA- ácido γ -amino butírico (do inglês, γ -amino butiric acid)

GAD- decarboxilase do ácido glutâmico (do inglês, glutamic acid decarboxilase)

GAT- transportador do ácido γ -amino butírico (do inglês, γ -amino butiric acid transporter)

GBSS- solução salina de Gey (do inglês, Gey's basal salt solution)

GFAP- proteína fibrilar ácida glial (do inglês, glial fibrillary acidic protein)

GFP- proteína fluorescente verde (do inglês, green fluorescent protein)

HRP- horseradish peroxidase

Ig- Imunoglobulina

i.p.- intraperitoneal

Mash1- fator de transcrição (do inglês, Mammalian achaete scute Homolog 1)

NCAM- molécula de adesão celular neural (do inglês, neural cell adhesion molecule)

NeuN- proteína nuclear neuronal

Ngn2- neurogenina 2

NT- neurotrofina

OCT- meio de inclusão para corte em criostato (do inglês, optimal cutting temperature)

ODC- decarboxilase da ornitina (do inglês, ornithin decarboxilase)

Pax6- fator de transcrição (do inglês, paired box gene 6)

PBS- solução tampão fosfato com salina (do inglês, phosphate buffer saline)

PCA- ácido perclórico

PFA- paraformaldeído

POPOP- 2-p-phenylenebis 5-pheniloxazol

PPO- 2,5-dipheniloxazol

PSA- ácido polissialico (do inglês, polysialic acid)

REST- fator de transcrição ligado à diferenciação neuronal (do inglês, repressor element 1

(RE1)-silencing transcription factor)

RMS- via migratória rostral (do inglês, rostral migratory stream)

RNA_m- ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, messenger ribonucleic acid)

RT-PCR- reação de múltiplas cadeias com transcriptase reversa (do inglês, reverse transcriptase poly chain reaction)

STAT3- fator de transcrição (do inglês, signal transducer and activator of transcription-3)

SVZ- zona subventricular (do inglês, subventricular zone)

SVZ_a- zona subventricular anterior

TH- tirosina hidroxilase

TLC- cromatografia de camada fina

Tris- Tris (hidroximetil) aminoetano

Tuj1- anticorpo monoclonal que reconhece a β -tubulina de classe III

VZ- zona ventricular (do inglês, ventricular zone)

ZM- zona marginal

RESUMO

A zona subventricular (SVZ) é um sítio de contínua neurogênese em mamíferos pós-natos e adultos. Ao longo de toda a vida, os progenitores neuronais gerados destinam-se ao bulbo olfatório (BO) para onde migram através da via migratória rostral (RMS). Uma vez no BO, os novos neurônios se diferenciam em neurônios GABAérgicos que integram-se à circuitaria local. A expressão de GABA inicia ainda na zona germinativa. Essa expressão precoce poderia levar a hipótese de que estes progenitores já estariam comprometidos com o fenótipo GABAérgico. Porém, para demonstrar seu comprometimento GABAérgico, um dos passos necessários é mostrar que a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), a enzima que sintetiza GABA em neurônios maduros, está presente nestas células. Nesta tese mostramos que a expressão e atividade enzimática de GAD, são muito baixas na SVZ. Revelamos que o GABA presente em neurônios imaturos da SVZ provém de uma via de síntese alternativa, a via da putrescina. Para analisar a importância do GABA proveniente de putrescina para estas células realizamos a inibição farmacológica de sua síntese através da administração de DFMO. Observamos que o tratamento com DFMO regula positivamente a expressão de GAD na SVZ e RMS. Mostramos também que os neuroblastos da SVZ que expressam GABA são realmente plásticos quanto a sua escolha de fenótipo neuroquímico. Quando explantes de SVZ são co-cultivados com fatias de telencéfalo embrionário dorsal, sítio de geração de neurônios glutamatérgicos, uma subpopulação se diferencia em neurônios GABAérgicos e outra menor em glutamatérgicos. Sugerimos, portanto, que a via da putrescina permite que neurônios imaturos sintetizem GABA sem, no entanto, haver comprometimento com o fenótipo GABAérgico. Esta produção de GABA parece ser importante para a migração de neuroblastos da SVZ, embora não tenhamos tido sucesso em mostrar um papel na proliferação com o decréscimo na produção do precursor putrescina. Mostramos que a liberação de GABA de putrescina parece ter um papel em inibir a expressão de GAD nestes neuroblastos. Em contrapartida, a subregulação desta sinalização levaria ao comprometimento pelo fenótipo GABAérgico. Se mudarmos os sinais apresentados às células da SVZ, como àqueles presentes na VZ do telencéfalo embrionário, pelo menos uma de suas subpopulações é capaz de mudar seu destino fenotípico, e diferenciar-se em neurônios glutamatérgicos piramidais.

ABSTRACT

The subventricular zone (SVZ) is proliferative epithelium that continuously gives rise to new neurons in postnatal and adult mammals. The neurons generated in the SVZ migrate through the rostral migratory stream (RMS) where they differentiate in GABAergic interneurons. A characteristic of these neuron precursors is that they start to express GABA while they are still in the SVZ. This fact can lead to the conclusion that at this time they are already committed to the GABAergic phenotype. However, to affirm this one has to show that the origin of GABA in these cells is the same as in mature neurons. One of the most important steps to define GABAergic commitment in neurons is to demonstrate the expression of glutamic acid decarboxylase (GAD), the synthetic enzyme for GABA in mature neurons. Here we show that SVZ cells display low levels of GAD immunocytochemistry and enzyme activity as compared with the olfactory bulb. We also show that these cells are able to synthesize GABA using an alternative source, the putrescine pathway. To test the importance of putrescine made GABA *in vivo*, we pharmacologically inhibited putrescine synthesis through DFMO administration. We observed that this treatment lead to an increase of GAD expression in the SVZ and RMS. We also show here that SVZ cells can display phenotypic plasticity. Co-culturing SVZ explants and dorsal telencephalic slices, a spot of glutamatergic neurogenesis, we observed that a subpopulation of SVZ derived neurons differentiated into GABAergic neurons and another into glutamatergic pyramidal neurons. Our working hypothesis is that the putrescine pathway is a mechanism to synthesize GABA without commitment to the GABAergic phenotype. The release of putrescine derived GABA inhibits GAD expression leaving these neuroblasts in an undifferentiated state. The inhibition of putrescine synthesis caused an upregulation of GAD expression which would lead to GABAergic commitment. If we present these neuroblasts with different signals, as those present in the embryonic dorsal telencephalon, they would show plasticity in their phenotypic fate and differentiate into other neurochemical and morphological phenotypes, one of which is the glutamatergic pyramidal neuron.

1-Introdução:

1.1-Apresentação do problema experimental

A Zona Subventricular (SVZ, do inglês *subventricular zone*) é um sítio de neurogênese contínua no telencéfalo de mamíferos adultos (Altman, 1969; para revisão, Gage, 2000). Os neuroblastos gerados nesta região migram em direção ao bulbo olfatório ipsilateral (Altman, 1969; Luskin, 1993), onde se diferenciam em neurônios granulares e periglomerulares (Luskin, 1993). Uma característica compartilhada por estes dois tipos celulares é a especificação de GABA como neurotransmissor (Betarbet *et al.*, 1996; Hack *et al.*, 2005).

Os neuroblastos (células comprometidas com o fenótipo neuronal mas ainda capazes de reentrar no ciclo celular; Menezes *et al.*, 1995) da SVZ expressam GABA durante a sua migração (Bolteus e Bordey, 2004; Sequerra *et al.*, 2007). A expressão de GABA em neuroblastos sugere um comprometimento precoce com o fenótipo GABAérgico. Porém resultados recentes de nosso grupo, e que compõem parte desta tese, sugerem que estas células possam alterar seu destino fenotípico em função do ambiente. Os primeiros resultados que apontam para a plasticidade destas células foram obtidos através da co-cultura de explantes de SVZ pós-natal com fatias organotípicas de telencéfalo embrionário (para resumo, Sequerra *et al.*, 2003). Neste sistema, as células da SVZ integram-se ao córtex cerebral e migram radialmente através da zona ventricular até a placa cortical dando origem a múltiplos morfotipos. Dentre estes, estão células de morfologias que em muito se assemelham a de neurônios piramidais, com corpo celular em forma de pirâmide, dendritos basais e um dendrito apical com espinhas (Miller e Peters, 1981; Peters e Kara, 1985). Os

neurônios piramidais corticais são em sua maioria neurônios glutamatérgicos (Kaneko e Mizuno, 1988). Além disso, conseguimos marcar essas células com o anticorpo contra L-glutamato, mostrando que progenitores da SVZ são capazes de dar origem a fenótipos neuroquímicos que não são gerados normalmente por elas no tecido íntegro.

Em uma segunda linha de investigação, estudamos os possíveis mecanismos subjacentes à plasticidade fenotípica que encontramos nas células da SVZ. Caracterizamos a síntese de GABA dentro da SVZ tendo em vista os resultados obtidos que indicam que as células podem alterar seu destino fenotípico e, portanto não estariam comprometidas como nos fazia supor a expressão precoce de GABA em neuroblastos. Há algumas décadas foi descrito que a via de síntese de GABA encontrada em neurônios GABAérgicos maduros consiste na descarboxilação do ácido glutâmico através da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) que em mamíferos possui dois genes (Bu *et al.*, 1992) que produzem duas formas reguladas independentemente (GAD65 e 67, Fenalti *et al.*, 2007). A presença de GAD seria um sinal do comprometimento destes progenitores (Mugnaini e Oertel, 1985). Entretanto, uma segunda via que utiliza a putrescina como precursor para a síntese de GABA foi descrita a partir da década de 50 (Jakoby e Fredericks, 1959; Seiler e Al-Therib, 1974) e células não necessitariam expressar GAD para obter esta molécula. Supomos, portanto, que esta via alternativa poderia prover o substrato para a plasticidade das células da SVZ. Nossos resultados mostram que as células da SVZ são capazes de converter putrescina em GABA e que a expressão de GAD por essas células é muito baixa ou inexistente (Sequeria *et al.*, 2007).

E qual seria a relevância do GABA oriundo da síntese de putrescina para as células da SVZ? Para abordar essa questão realizamos a inibição farmacológica da enzima de síntese de putrescina, a descarboxilase de ornitina (ODC), através da administração sistêmica de

di-fluoro-metil-ornitina (DFMO). Nossos resultados preliminares mostram que o GABA de putrescina é um regulador do ciclo mitótico e sugerem que a expressão de GAD é inibida por GABA proveniente desta via.

O texto que segue coloca no contexto da literatura as questões abordadas aqui.

1.2-Zona Subventricular, Zona Subependimária e Via Migratória Rostral: Problemas Terminológicos

A estrutura mais precoce a qual se dá o nome de zona subventricular, surge durante a neurogênese telencefálica, o que no camundongo acontece em E13 (Smart, 1973). Os critérios principais para a sua classificação neste período são, na verdade, baseados na exclusão de características presentes na outra camada germinativa embrionária, a zona ventricular (VZ). Diferente da zona ventricular, na SVZ, as células proliferativas entram em mitose longe da superfície do ventrículo, as ditas mitoses (Comité Boulder, 1970; Takahashi *et al.*, 1995). As células em divisão não tocam a superfície ventricular, e há ausência de uma migração nuclear intercinética definida. O termo “migração intercinética” se refere ao processo de migração do núcleo celular das células proliferativas da VZ que se inicia no fim da fase M na superfície ventricular, vai até a fase S na porção mais afastada desta superfície e termina com uma nova mitose de volta a superfície ventricular (Sauer, 1935, para revisão ver Menezes *et al.*, 2002; Fig.1A).

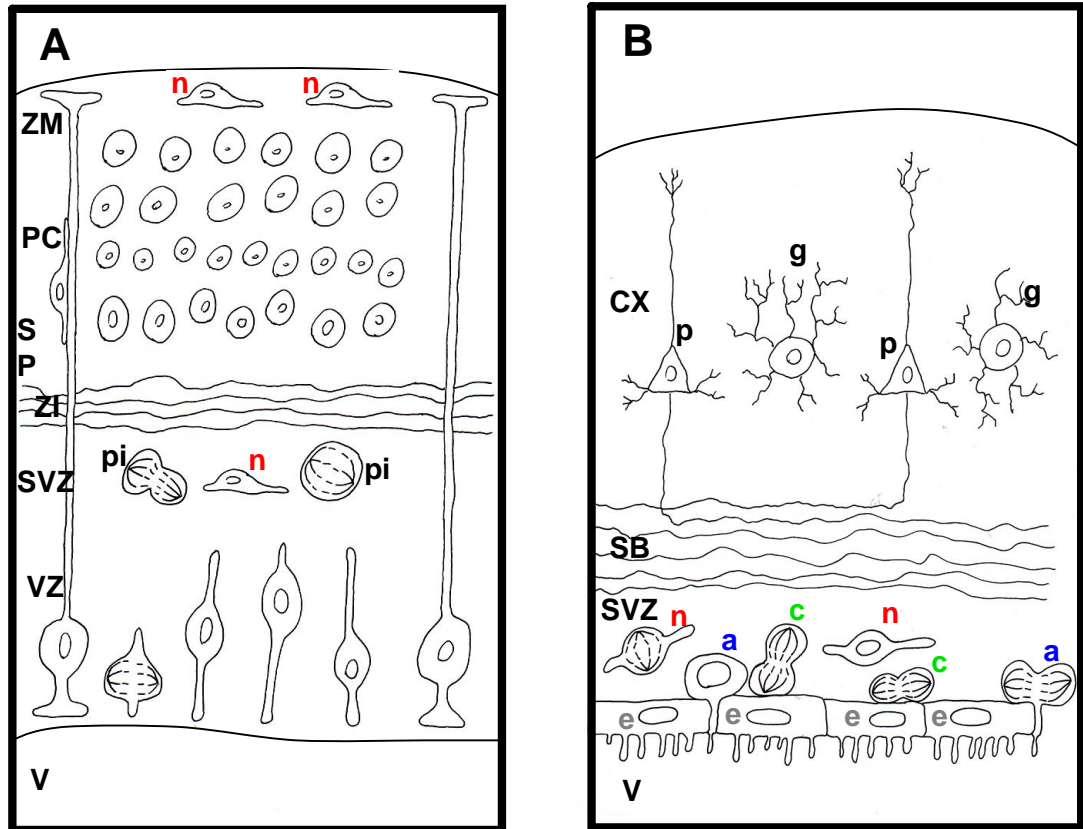


Figura 1. Esquema da SVZ embrionária (A) e pós-natal (B). Em A, as células da SVZ embrionária (aqui a SVZ dorsal como exemplo) se caracterizam por proliferar longe do ventrículo lateral, e não realizarem a migração intercinética (movimento nuclear do ciclo celular esquematizado na VZ). Essa camada se localiza entre a VZ e a Zona Intermediária (ZI), por onde trafegam os axônios subcorticais e corticais em crescimento. Acima da Subplaca (SP) começa a se formar a placa cortical composta por neurônios imaturos que utilizam as fibras de glia radial para migrar da ZV até a superfície da CP. A maioria destes neurônios podem ser originados na VZ mas algumas populações passam por ciclos proliferativos na SVZ. Além disso, a SVZ/ZI/SP e a Zona Marginal (ZM) servem de vias migratórias para neuroblastos gerados extracorticalmente mas também intracorticalmente. **B.** Após o desaparecimento da VZ, a SVZ passa a ser a camada proliferativa mais próxima da luz do ventrículo. A glia radial se transforma dando origem a células do epêndima (e) e astrócitos. Os astrócitos da SVZ (a) (e talvez o epêndima) dão origem a precursores de ciclo rápido (c) que por sua vez geram neuroblastos (n), que diferente dos neuroblastos migratórios embrionários mantém seu ciclo celular. Acima da SVZ dorsal está a Substância Branca (SB) e acima desta o córtex cerebral (CX). No CX estão representados os dois principais tipos neuronais do córtex cerebral os neurônios piramidais glutamatérgicos (p) e os interneurônios GABAérgicos (g).

Porém existem críticas quanto à adoção de tais critérios para classificar este sítio progenitor de SVZ. A identificação da proliferação abventricular só é possível até a primeira semana pós-natal. Após este período as células que formavam a VZ já realizaram a sua divisão terminal e a VZ se extingue (Schmechel e Rakic, 1979; Voigt, 1989; Gaiano *et al.*, 2000; Tramontin *et al.*, 2003; Fig.1B). Assim a SVZ passa a ser a camada proliferativa mais próxima ao ventrículo e a apresentar células que proliferam e tocam a luz ventricular (Doetsch *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1999; Fig.1B). Quanto à ausência de migração intercínética, as células dentro da via migratória rostral (RMS, a rota migratória dos neuroblastos até o bulbo olfatório, veja a seguir) se localizam preferencialmente na periferia desta quando estão na fase S do ciclo celular (Menezes *et al.*, 1998), o que pode indicar um possível padrão migratório correlacionado com a fase do ciclo celular. Logo, os critérios utilizados não são suficientes para distinguir a SVZ em todos os momentos da sua existência.

Uma outra terminologia utilizada para esta camada proliferativa é zona subependimária ou camada subependimária. A origem dessa terminologia está na caracterização desta em indivíduos adultos (Globus e Kuhlenbeck, 1944). De fato em adultos, a SVZ fica separada da luz ventricular por uma camada de células endimárias (Fig.1B) que se caracterizam por apresentar marcadores tais como a proteína S100 beta (i.e. Spassky *et al.*, 2005) e cílios com atividade motora (Bleier, 1971; Millhouse, 1971). Porém a separação entre a camada endimária e a subependimária não é completa uma vez que os astrócitos da SVZ emitem prolongamentos monociliados que passam entre as células endimárias e tocam a luz ventricular (Doetsch *et al.*, 1999). Existe também a possibilidade de que as próprias células endimárias sejam parte integrante desta camada proliferativa desempenhando o papel de progenitores de atividade quiescente (Johansson *et*

al., 1999; Momma *et al.*, 2000; Coskun *et al.*, 2008). Além disso, as células endoteliais emitem prolongamentos para dentro da SVZ e tocam a lâmina basal produzida por células que compõem os vasos sanguíneos dentro desta camada (Mercier *et al.*, 2002). Nós optamos aqui por usar a terminologia zona subventricular por esta se adequar melhor à idéia de continuidade temporal entre a camada gerada no embrião e aquela que mantém a sua atividade proliferativa por toda a vida do animal. Esta opção se baseia no fato de que não há mudanças substanciais entre os tipos celulares presentes na SVZ do animal pós-natal e adulto. Dito isto, no entanto, ressalvo que no período perinatal há a presença de células de glia radial em maior número que formam uma paliçada nas bordas ventral e dorsal da zona subventricular do córtex cerebral (Alves *et al.*, 2002; Tramontin *et al.*, 2003). Estas podem potencialmente representar uma população distinta de progenitores além dos tipos já descritos como as células A, células B e células C (Doetsch *et al.*, 1999).

Existem também controvérsias quanto à extensão rostro-caudal da SVZ. Os neuroblastos gerados na SVZ migram para o bulbo olfatório (BO) ipsilateral onde se diferenciam em interneurônios (Altman, 1969; Luskin, 1993). A via migratória por onde esses neuroblastos se deslocam até o seu destino foi denominada via migratória rostral (RMS; Altman, 1969; Fig.2B). Estas células migratórias são capazes de proliferar neste percurso (Menezes *et al.*, 1995) estendendo a zona proliferativa da SVZ até o bulbo olfatório. Duas diferentes formas de denominação da extensão da SVZ se apresentam na literatura. A primeira trata a RMS como uma extensão da SVZ, parte integral desta zona proliferativa. A outra separa a RMS em uma região diferente com diferentes propriedades. De fato, parece haver alguns progenitores que só estão presentes dentro da RMS e da SVZ do BO e dão origem a neurônios de um tipo específico, sugerindo independência da SVZ posterior (Hack *et al.*, 2005; Vergaño-Vera *et al.*, 2006). Porém, recentemente constatou-se

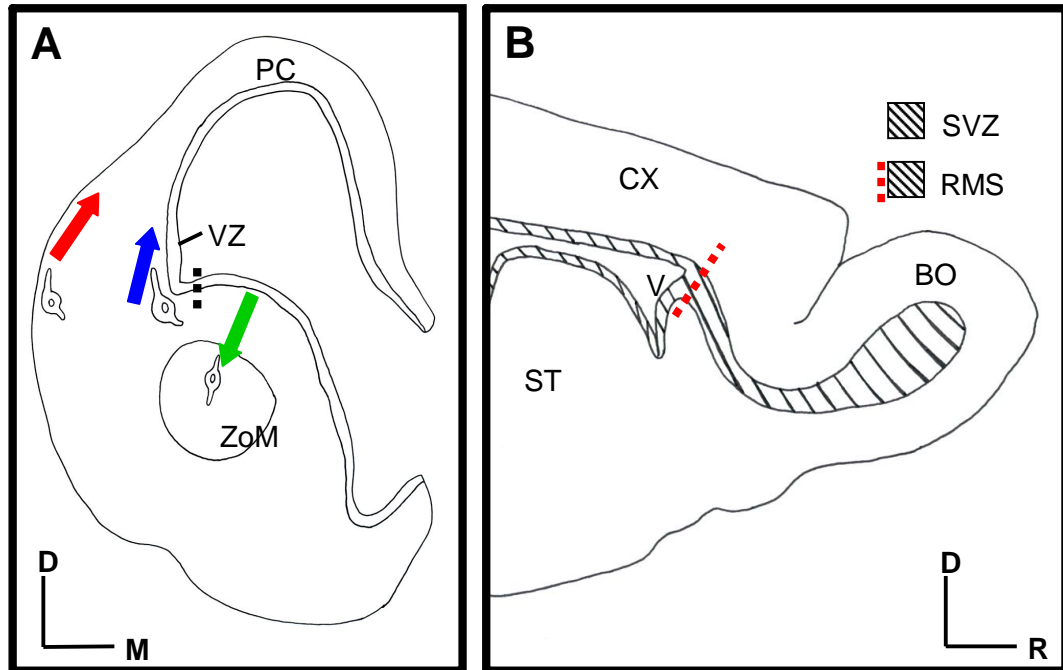


Figura 2. Esquema de rotas migratórias de neurônios GABAérgicos no roedor embrionário (A) e pós-nato (B). **A.** Esquema de corte coronal de um hemisfério cerebral. As células GABAérgicas no embrião são geradas em porções da VZ ventrais à borda pálido-subpálido (linha tracejada preta). De lá, elas adotam diversas rotas migratórias, as rotas de migração para a placa cortical (PC) pela ZM (seta vermelha) e ZI/SVZ (seta azul), a rota de migração para a zona do manto (ZoM, futuro corpo estriado), e a rota migratória para o bulbo olfatório (não representada). **B.** Esquema de um corte parassagital do telencéfalo de um roedor pós-nato ou adulto. A SVZ (região listrada) envolve o ventrículo lateral e se projeta rostralmente até o bulbo olfatório (BO). A região da SVZ à direita da linha tracejada vermelha é chamada de via migratória rostral (RMS). CX- córtex cerebral, ST- corpo estriado, ZoM – zona do manto. D- dorsal, M- medial, R- rostral.

que as células-tronco neurais ao longo de todos os eixos da SVZ possuem diferentes potenciais quanto a geração de tipos neuronais do BO (Merkle *et al.*, 2007) não sendo esta uma característica exclusiva da camada proliferativa adjacente ao BO. Além disso, como dito anteriormente, diferente de outras rotas migratórias, como a de progenitores GABAérgicos das eminências ganglionares para o córtex cerebral (Anderson *et al.*, 2001; Polleux *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Zimmer *et al.*, 2004; Fig.2A), os neuroblastos migratórios da RMS mantém o ciclo celular (Menezes *et al.*, 1995). A existência de células-tronco neurais ao longo de toda a extensão da RMS (Gritti *et al.*, 2002) como a presença de todo um conjunto de progenitores (Jankowski e Sotelo, 1996) contribuem para a idéia de que a RMS (que tecnicamente não serviria como *nomina* de estrutura anatômica por referir-se a um fenômeno) é na verdade uma extensão rostral da SVZ. Assim, nesta tese, quando nos referimos à SVZ incluímos as células da SVZ que margeiam os ventrículos laterais, as dorsais subjacentes ao córtex cerebral, as ventro-laterais subjacentes ao corpo estriado e as ventro-mediais subjacentes ao *septum*, e às células que estão na sua extensão rostral.

1.3- Especialização progressiva da camada proliferativa embrionária

No início do desenvolvimento do sistema nervoso, este se diferencia de um epitélio que parece ser constituído por uma população homogênea de células. Porém ao longo do desenvolvimento estas células recebem diversos sinais que imprimem diversas informações como por exemplo sua posição nos eixos corporais (para revisão, Lupo *et al.*, 2006). Durante a gástrula, as células mais anteriores do tecido neural são expostas ao morfógeno Sonic Hedgehog. Essa sinalização faz com que estas células adquiram uma identidade ventral definida pela expressão de certos fatores de transcrição Nkx2.2 e Dlx (Gunhaga *et*

al., 2000). E assim que o tubo neural se fecha na porção anterior, a ectoderme epidermal adjacente passa a sinalizar Wnt e BMP para as células mais dorsais que bloqueiam a identidade ventral e passam a expressar fatores de transcrição como Emx1 e Mgn2 (Gunhaga et al., 2003).

Assim de acordo com a posição dorso-ventral de cada célula dentro do epitélio proliferativo, esta passa a expressar diferentes repertórios de fatores de transcrição (Schoorjans e Guillemot, 2002). Outra consequência da informação posicional que estes progenitores adquirem é que estes passam a gerar diferentes tipos neuronais. Os progenitores dorsais que expressam o fator de transcrição Emx1, por exemplo, geram neurônios glutamatérgicos, mas são incapazes de gerar neurônios GABAérgicos (Gorski et al., 2002). Assim, a geração dos diferentes tipos neuroquímicos do telencéfalo acontece de maneira segregada espacialmente ao longo do epitélio proliferativo embrionário, sendo os neurônios GABAérgicos gerados em porções ventro-laterais (Marin e Rubenstein, 2001)

O epitélio proliferativo, que em idades mais avançadas chama-se zona ventricular (VZ; Comitê Boulder, 1970; Comitê Boulder Revisitado, Bystron et al., 2008) passa por ainda mais especificações. Trabalhos iniciais mostraram que a VZ dorsal dá origem a neurônios de todas as camadas corticais de maneira tempo dependente (Angevine e Sidman, 1961; McConnell, 1988). Em um primeiro momento originam-se nesta camada proliferativa os neurônios que irão formar a préplaca ou camada plexiforme primordial (Raedler e Raedler, 1978). Esta posteriormente será partida por células que irão formar a placa cortical propriamente dita. Esta partição dá origem a duas novas camadas embrionárias, a zona marginal (ZM), na superfície cerebral e a subplaca subjacente à placa cortical (PC) (Comitê Boulder, 1970; Bystron et al., 2008). As células Cajal-Retzius que formam a ZM/camada I são em sua maioria glutamatérgicas e seriam geradas na VZ (Del

Rio et al., 1995; Hevner et al., 2003). A neurogênese das células Cajal-Retzius é interrompida pelo início da expressão de Foxg1 na VZ e os mutantes desse fator de transcrição produzem um excesso dessas células (Hanashima et al., 2004).

Após essa primeira população ser gerada, as populações de neurônios de projeção das demais camadas corticais são formadas (Rakic, 1974). Como os neurônios das camadas superiores são gerados por último (Angevine e Sidman, 1961), os progenitores que dão origem a essas células são mais restritos quanto à diversidade da progênie que são capazes de gerar em comparação às populações anteriores (Frantz e McConnell, 1996; Mizutani e Saito, 2005). Isto sugere uma especificação progressiva na VZ. Desta forma, assim como há um comprometimento progressivo dos progenitores da VZ durante a embriogênese há também a expressão sucessiva de diferentes fatores de transcrição que estão envolvidos nesta especificação (para revisão, Molyneaux et al., 2007). De forma correlacionada a zona ventricular também parece produzir de forma seqüencial neurônios e glia (Quian et al., 2000).

1.4- Origem da SVZ e transição para a idade adulta

Durante o desenvolvimento embrionário do telencéfalo dorsal, uma população de células deixa a VZ cortical e se estabelece na SVZ onde continua a proliferar (Comité Boulder, 1970; Smart e Mc Sherry, 1982; Takahashi *et al.*, 1995). A observação de que a origem da SVZ e o início do declínio da VZ em primatas ocorrem em fases muito precoces, anteriores ao início da gliogênese, levou à formulação da hipótese de que a SVZ poderia dar origem a neurônios corticais (Sidman e Rakic, 1973; Smart *et al.*, 2002). Essa coincidência temporal entre a formação da SVZ e o pico de neurogênese cortical foi

também observada em camundongos, levando à mesma conclusão (Smart e Mc Sherry, 1982). Nos últimos anos o desenvolvimento de marcadores específicos das lâminas corticais trouxe novos dados para a caracterização desta população. O primeiro trabalho a mostrar um destes marcadores mostrou que uma população de células da VZ sai desta camada proliferativa, migra para a SVZ expressando Otx1. Já na SVZ essas células deixam de expressar esse fator de transcrição, passam a expressar o RNA não codificante *svet1* enquanto passam por alguns últimos ciclos mitóticos, e se deslocam para compor as camadas II a IV (Tarabykin *et al.*, 2001). A hipótese de que a SVZ dá origem a neurônios das camadas granular e supragranular (IV e II/III) foi depois reforçada por trabalhos mostrando o padrão de expressão dos fatores de transcrição Cux 1 e 2 (Zimmer *et al.*, 2004; Nieto *et al.*, 2004). Além disso, Cux2, e provavelmente Cux1, é expresso também na população de neurônios imaturos *Dlx+* que irão formar os neurônios inibitórios das camadas II a IV e que migram pela SVZ e zona marginal (ZM; Zimmer *et al.*, 2004). Esta população parece ser transitória na SVZ, uma vez que a expressão destes marcadores, *svet1*, Cux1 e 2, desaparece desta zona proliferativa após a neurogênese cortical e passa a somente existir nas camadas II à IV. O mesmo se aplica a dois outros fatores de transcrição Tbr1 e Tbr2 que são sequencialmente expressos após a subregulação de Pax6 pelas células de glia radial na zona ventricular dorsal (Englund *et al.*, 2005). Estes marcadores aparecem inicialmente na zona subventricular e mais tarde na placa cortical.

A VZ das eminências ganglionares (EG, estruturas transitórias localizadas no telencéfalo embrionário ventral e possuem um número alto de células proliferantes; Fig.2A) dá origem a precursores que formarão os neurônios estriatais, do globo pálido, do bulbo olfatório e do córtex cerebral (Wichterle *et al.*, 2001, Fig.2A). Ao migrarem da VZ ventral estas param na SVZ onde passam por um passo de maturação indicado pelo início da

expressão dos fatores de transcrição Dlx1/2 (Einsenstat *et al.*, 1999). Quando saem das EGs, essas células podem migrar tanto pela SVZ/zona intermediária dorsal como pela zona marginal em direção ao córtex cerebral (ZM; Fig.2A). Essas células migratórias são pós-mitóticas (Anderson *et al.*, 2001; Polleux *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Zimmer *et al.*, 2004).

Durante o fim da neurogênese embrionária do telencéfalo, os precursores da SVZ passam a gerar astrócitos e oligodendrócitos para esta região (Privat, 1975; Levine e Goldman, 1988a,b; Levison *et al.* 1993; Luskin e McDermott, 1994; Kessaris *et al.*, 2006). Apesar da neurogênese da maioria das regiões telencefálicas ter terminado, duas estruturas continuam tendo a adição de novos neurônios à suas populações, o hipocampo e o bulbo olfatório (Altman e Das, 1965; Altman, 1969; Bayer, 1985). A adição de novos neurônios ao bulbo olfatório deve-se à geração destes na SVZ e sua migração em direção a esta estrutura pela via migratória rostral (RMS; Altman, 1969; Luskin, 1993; Fig.2B). Porém esses novos neurônios adicionados pós-natalmente são apenas de dois tipos, os granulares e periglomerulares (Bayer, 1985; Luskin, 1993). A maior parte dos novos neurônios gerados na camada granular e glomerular são GABAérgicos (Betarbet *et al.*, 1996; Hack *et al.*, 2005). Porém as novas células geradas podem também assumir um fenótipo dopaminérgico na camada glomerular (Betarbet *et al.*, 1996; Hack *et al.*, 2005, Kohwi *et al.*, 2005) e na camada granular superficial (Kohwi *et al.*, 2005). Um mesmo neurônio pode expressar dois neurotransmissores, GABA e dopamina, o que ocorre em praticamente todos os periglomerulares dopaminérgicos (Hack *et al.*, 2005; Panzanelli *et al.*, 2007).

Durante o desenvolvimento embrionário do telencéfalo, o sistema de células-tronco neurais está baseado nas células de glia radial que funcionam como progenitores dos neurônios (Noctor *et al.*, 2000; Tamamaki *et al.*, 2001, Malatesta *et al.*, 2003) ou dos precursores intermediários neuronais (Tarabykin *et al.*, 2001; Miyata *et al.*, 2004; Noctor *et*

al., 2004). Porém ao fim da histogênese telencefálica de mamíferos, a VZ se extingue (Schmechel e Rakic, 1979; Voigt, 1989; Gaiano *et al.*, 2000; Tramontin *et al.*, 2003) o que não acontece em outros vertebrados (Dahl *et al.*, 1985; Alvarez-Buylla e Nottebohm, 1988; Zupanc, 2001; Font *et al.*, 2001; Kálman e Pritz, 2001; Garcia-Verdugo *et al.*, 2002;). Após o fim da VZ em mamíferos, a SVZ passa a constituir o principal sistema de células tronco telencefálico (para revisão, Alvarez-Buylla *et al.*, 2001).

Há controvérsias na literatura sobre qual seria o tipo celular responsável pelo sistema de células-tronco neurais de mamíferos adultos. A injeção da carbocianina lipofílica (DiI) ou de um adenovírus contendo o gene da β -galactosidase no ventrículo lateral de ratos e camundongos, marca especificamente as células endimárias e essas células dão origem à outras células que povoam a SVZ e o bulbo olfatório (Johansson *et al.*, 1999). Utilizando esses mesmos marcadores, a presença de Notch1 (Weinmaster *et al.*, 1992), ou a presença de cílios, este mesmo grupo mostrou que uma pequena porcentagem dessas células é capaz de dar origem a neuroesferas (Johansson *et al.*, 1999), um critério amplamente utilizado para a identificação de células-tronco neurais (Reynolds *et al.*, 1992; Reynolds e Rietze 2005). Porém apesar de Johansson e colaboradores (1999) afirmarem encontrar células endimárias proliferativas após tratamentos de longo prazo com H^3 -timidina, Doetsch e colaboradores (1999a) afirmam serem incapazes de observar a marcação dessas células após duas semanas de administração de H^3 -timidina ou BrdU (bromo-deoxiuridina), análogo de timidina. Além disso, outros grupos foram incapazes de produzir neuroesferas a partir de células endimárias (Chiasson *et al.*, 1999; Laywell *et al.*, 2000; Capela e Temple, 2002; Doetsch *et al.*, 2002). Doetsch e colaboradores propuseram que os astrócitos da SVZ é que seriam de fato as verdadeiras células-tronco neurais dos mamíferos adultos,

uma vez que quando todos os tipos celulares de ciclo mitótico rápido são eliminados pelo tratamento com citosina- β -D-arabinofuranosídeo (Ara-C, Doetsch *et al.*, 1999b), essas células são capazes de recompor a população da SVZ (Doetsch *et al.*, 1999a). O que se sabe, então é que pelo menos uma subpopulação dos astrócitos da SVZ (denominados de células B Doetsch *et al.*, 1997) é capaz de gerar os outros tipos celulares desta camada, os precursores transitórios (células C) e os neuroblastos migratórios (células A), e que algumas células do epêndima podem ser células-tronco quiescentes (Johansson *et al.*, 1999; Momba *et al.*, 2000; Coskun *et al.*, 2008).

Estudos da progênie da glia radial utilizando um sistema de recombinase que ativa a expressão de um gene marcador, mostraram que a glia radial dá origem a células endimárias (Spassky *et al.*, 2005) e a astrócitos da SVZ (Merkle *et al.*, 2004). Além disto, estudos analisando o curso temporal de transformação da glia radial em astrócitos no córtex cerebral *pos mortem* (Alves *et al.*, 2002) em roedores sugerem que a glia radial dá origem a uma população celular GFAP positiva nas margens da SVZ que permanece até a maturidade (Menezes, comunicação pessoal). Assim independente do fato das células endimárias serem ou não progenitores no adulto, a transição entre o sistema embrionário de células-tronco baseado nas células de glia radial, e o sistema de progenitores do adulto é bem clara.

Uma das características dos neuroblastos migratórios da SVZ é a sua expressão da β -tubulina da classe III, reconhecida pelo anticorpo Tuj1 (Menezes e Luskin, 1994). No rato, a primeira população Tuj1⁺ a aparecer surge em E14 em uma estrutura localizada abaixo da porção mais anterior do ventrículo lateral, o rinencéfalo (Pencea e Luskin, 2004). Essas células estão originalmente organizadas de forma aleatória nesta estrutura, mas já em E15

ganham uma orientação em direção ao ventrículo olfatório. Em E16, essas células já estão organizadas em uma via migratória densa semelhante à RMS pós-natal que aparece como uma via migratória completa até o bulbo em E18 (Pencea e Luskin, 2004). Então a primeira população Tuj1⁺ a popular a RMS surge a partir da porção anterior do telencéfalo.

Este dado sustenta a hipótese de que somente a SVZ anterior (SVZa) seria capaz de dar origem a neurônios enquanto as porções mais caudais da SVZ seriam gliogênicas (Luskin, 1993). Essa hipótese foi formulada a partir de experimentos de injeção de retrovírus na SVZ que comprovaram que somente a SVZa daria origem a neuroblastos migratórios que se diferenciam no bulbo olfatório (Luskin, 1993). Porém como o título do vírus injetado era muito baixo, uma possível explicação para esses dados seria que estes estariam refletindo a maior concentração celular na porção anterior da SVZ (SVZa), por esta ser obrigatória à passagem de todos os neuroblastos gerados na SVZ, inclusive os mais caudais. Assim o vírus de título baixo só foi capaz de infectar células nesta área simplesmente porque a probabilidade de infecção aumentaria no sentido anterior. E de fato, um experimento muito semelhante utilizando um retrovírus de título mais alto mostrou que as porções mais caudais possuem neuroblastos que migram rostralmente para o bulbo olfatório (Suzuki e Goldman, 2003). De fato, a marcação seletiva das células de glia radial mais caudais e sua progênie mostram que estas (que provavelmente se tornam astrócitos da SVZ no adulto) continuam dando origem a neurônios (Merckle *et al.*, 2007; Kelsch *et al.*, 2007).

1.5- Diversidade dos neurônios renováveis do BO

O bulbo olfatório é a única estrutura telencefálica que recebe informação diretamente da periferia. Os receptores presentes no epitélio olfativo enviam axônios para dentro do cérebro aonde se conectam com os dendritos das células mitrais em uma estrutura chamada glomérulo (Fig.3; Sheperd e Greer, 1990; Shipley *et al.*, 2004). As células mitrais são neurônios excitatórios que enviam seus axônios para alvos fora do BO como o córtex piriforme, onde se localiza a área primária olfatória. Porém, essa informação é regulada por interneurônios que se conectam a esses dois tipos neuronais (receptor olfatório e célula mitral) nas diversas camadas do BO.

Na camada glomerular existem três tipos neuronais, os neurônios periglomerulares, as células de axônio curto, e as células “tufted” externas (Fig. 3; Pinching e Powell, 1971a; Pinching e Powell, 1971b; Pinching e Powell, 1972). Acredita-se que essas células são neurônios inibitórios que expressam GABA e/ou dopamina. Porém recentemente mostrou-se que as células de axônio curto são responsáveis pela conexão entre glomérulos e que para isso utilizam o neurotransmissor glutamato (Aungst, 2003). Não há nenhuma evidência de que as células de axônio curto sejam originadas após o período embrionário.

Os interneurônios inibitórios da camada glomerular foram primeiro caracterizados pela expressão de enzimas de síntese de neurotransmissor (GAD e tirosina hidroxilase (TH), enzima de síntese de dopamina) ou ainda a expressão de GABA (Kosaka *et al.*, 1985; Betarbet *et al.*, 1996). Quanto à expressão de GABA, foram descritas duas populações de periglomerulares, uma positiva e outra negativa para o neurotransmissor (Kosaka e Kosaka, 2005; Parrish-Aungst, 2007). Porém a localização de GABA, assim como GAD,

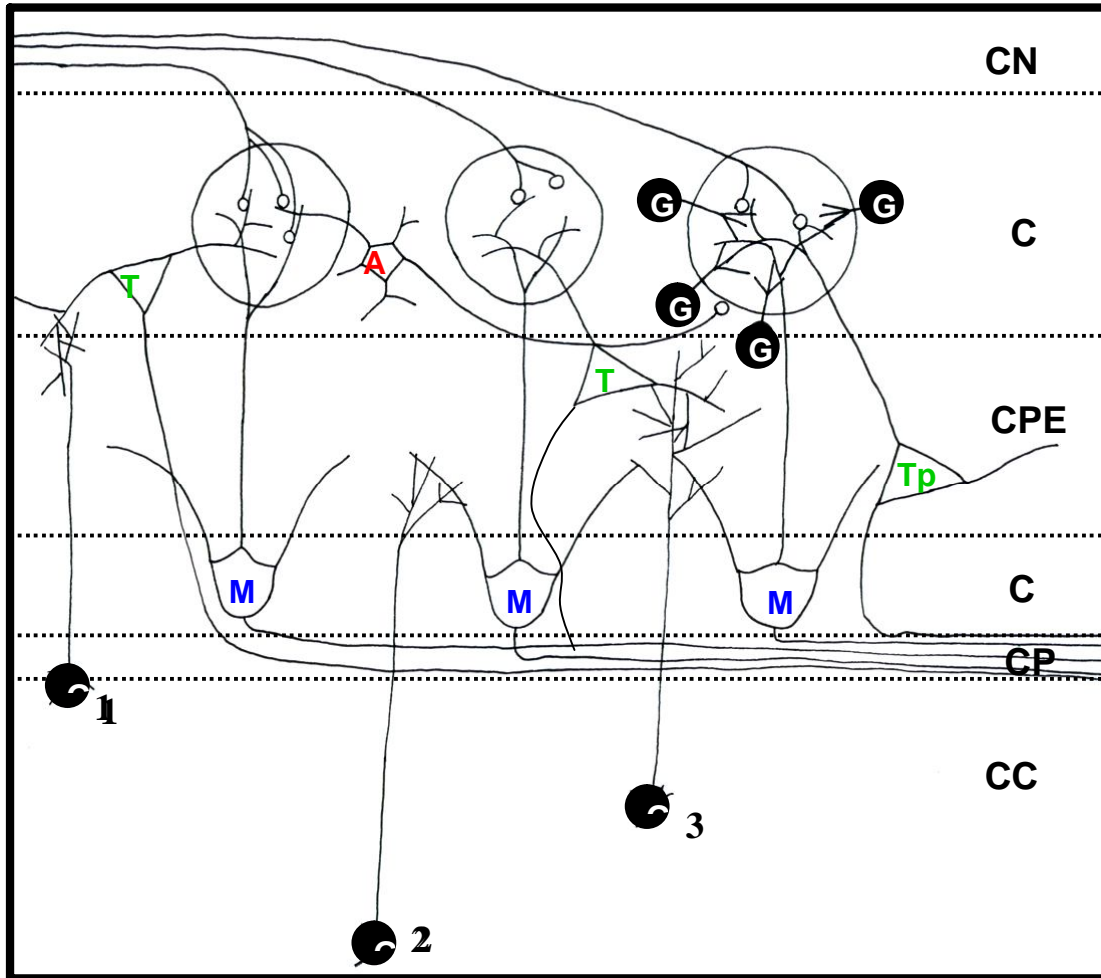


Figura 3. Esquema representativo da circuitaria do bulbo olfatório principal. O bulbo olfatório possui 6 camadas: camada de células granulares (CCG), camada plexiforme interna (CPI), camada mitral (CM), camada plexiforme externa (CPE), camada glomerular (CG), e camada do nervo olfatório (CNO). A camada glomerular possui as células “tufted” externas (Te), as de axônio curto (Ac) e as periglomerulares (G). Além dessas células, há uma estrutura especializada onde os axônios do nervo olfatório conectam-se aos dendritos das células mitrais chamadas glomérulos (círculos). As células de axônio curto conectam glomérulos distantes. Na CPE estão principalmente as células “tufted” (T) e “tufted profundas” (Tp). Logo abaixo estão as células mitrais na CM. As células mitrais mandam seus axônios através da CPI. Na CCG estão representados os três tipos de células granulares: 1) as granulares superficiais, 2) as granulares profundas e 3) as granulares intermediárias.

preferencialmente em terminais sinápticos pode levar a uma classificação do corpo celular como negativo (para exemplo veja, Liu *et al.*, 1989). Essa característica pode revelar na verdade diferenças entre duas populações GAD65 e GAD67 positivas, já que se mostrou que em algumas regiões do encéfalo a GAD65 localiza-se preferencialmente em terminais enquanto a GAD67 marca mais corpos celulares (Esclapez *et al.*, 1994). De fato, camundongos que possuem o gene *gfp* regulado pelo promotor do GAD67 marcam todos os tipos de periglomerulares; e terminais pré-sinápticos dessas células marcam para GAD e o transportador vesicular de GABA em ratos e camundongos (Panzanelli *et al.*, 2007). Assim, os neurônios periglomerulares parecem ser todos GABAérgicos e a observação de populações GABA negativas ter sido causada por limitações nas técnicas de detecção. Dentre essas células GABAérgicas, uma subpopulação pode co-expressar dopamina (Kosaka *et al.*, 1985; Betarbet *et al.*, 1996; Hack *et al.*, 2005) e outra óxido nítrico sintase (Weruaga *et al.*, 2000; Crespo *et al.*, 2003).

Existem dois tipos de conexão apresentados por neurônios periglomerulares. As células do tipo 1, que recebem sinapses excitatórias do nervo olfatório, e as do tipo 2, que não recebem sinapses dos axônios do nervo olfatório (Kosaka *et al.*, 1997; Toida *et al.*, 1998, 2000). Já os neurônios granulares são divididos em três grupos de acordo com sua posição na camada granular e seu padrão de projeção dendrítica. As células granulares superficiais têm dendritos que ramificam na camada plexiforme externa (EPL), entre os dendritos das células “tufted” (Orona *et al.*, 1983; Mori *et al.*, 1983). As células granulares profundas mandam seus dendritos principalmente para a EPL profunda, entre os dendritos das células mitrais. E as células granulares intermediárias mandam dendritos que ramificam por toda a extensão da EPL (veja também, Shepherd, 1990).

Os neurônios inibitórios da camada glomerular podem ainda ser classificados de acordo com a combinação de proteínas ligadoras de cálcio que expressam. Essas proteínas incluem calbindina D28K, calretinina, parvalbumina, neurocalcina e S100A6 (para revisão dos trabalhos mais antigos, Kosaka *et al.*, 1998). O cálculo das proporções dessas populações é complicado por não existir um marcador universal dos neurônios periglomerulares. A proteína nuclear neuronal (NeuN; Mullen *et al.*, 1992), que é amplamente utilizada como marcador neuronal geral, não é expressa em todos os neurônios da camada glomerular (Imamura *et al.*, 2006 ; Panzanelli *et al.*, 2007; Parrish-Aungst *et al.*, 2007). Um camundongo que tem a expressão de GFP regulada pelo promotor de *gad67* (Tamamaki *et al.*, 2003) serviu como um bom modelo para essa quantificação já que todas os marcadores utilizados neste estudo co-localizam com esse gene marcador (Panzanelli *et al.*, 2007). Segundo esta quantificação 44% das células são calretinina positivas, 16% são TH positivas, 14% são calbindina positivas, 13% são positivas para a subunidade $\alpha 5$ do receptor GABA_A, 13% não marcam para nenhum desses marcadores e essas populações não se sobrepõem (Panzanelli *et al.*, 2007). Já as células granulares não possuem tantos marcadores descritos, a não ser uma subpopulação de células calretinina positiva (Jacobowitz e Winsky, 1991).

Essas populações parecem estar presentes em uma ampla diversidade de mamíferos (Kosaka e Kosaka, 2004). Porém em insetívoros existe uma estrutura exclusiva que se forma entre as camadas glomerular e plexiforme externa. Essa estrutura formada por um aglomerado de células calbindina positivas que recebem alguns poucos axônios do nervo olfatório é chamada nidus (Alonso *et al.* 1995; Kosaka e Kosaka, 2004). Como essa estrutura aparece em topeiras e “shrews”, mas não em porcos-espinhos (Kosaka e Kosaka,

2004), não é possível definir se esta característica é primitiva em mamíferos ou se surgiu em um ancestral comum a essas duas espécies. Uma forma de resolver essa questão seria observar a imuno-histoquímica para calbindina em um metatério como o gambá, servindo como grupo externo. O tempo de geração dos neurônios do nidus não é conhecido.

E qual é o padrão de formação dessas diferentes populações? É bom lembrar que a SVZ é formada por um sistema de células tronco que é derivado das glias radiais do embrião (Alvarez-Buylla, 2001). Na idade embrionária essas glias radiais dividem-se em eixos morfogenéticos que definem seu padrão de expressão de diferentes fatores de transcrição e os tipos celulares que serão originados em cada ponto (Schoorjans e Guillemot, 2002; Marin e Rubenstein, 2001). Assim seria coerente dizer que cada astrócito derivado dessas glias radiais teria um diferente potencial de acordo com a sua glia radial progenitora. Para responder esta pergunta Merckle e colaboradores (2007) injetaram um adenovírus codificando uma recombinase em animais que tem a expressão de GFP condicionada ao contato com esta enzima. Como a recombinase tem sua expressão regulada pelo promotor de GFAP (um marcador astrocitário), os autores esperavam marcar somente os astrócitos que funcionam como células-tronco neurais em adultos (Doetsch *et al.*, 1999). Assim, realizando injeções em diferentes coordenadas estereotáticas eles conseguiram progenitores em diferentes posições ao longo da SVZ. O que eles observaram foi que cada região analisada dava origem a diferentes populações neuronais do BO. Outro grupo mostrou recentemente que células granulares geradas em porções mais anteriores da SVZ possuem um diferente padrão de conectividade quando comparadas àquelas geradas mais posteriormente (Kelsch *et al.*, 2007). Além disso, em ambos os casos quando os progenitores de uma certa área são heterotopicamente transplantados para outras regiões estes mantêm a identidade de sua região de origem (Merkle *et al.*, 2007; Kelsch *et al.*,

2007). Assim, as diferentes populações de neurônios renováveis do BO têm sua origem segregada ao longo dos eixos espaciais da SVZ, característica essa que é autônoma de cada célula.

Será que todos os neurônios renováveis do BO são gerados ao longo de toda a vida do animal ou há uma segregação temporal? Utilizando injeções de Fluorogold na SVZ, De Marchis e colaboradores (2007) mostraram que os neurônios periglomerulares calbindina positivos são gerados preferencialmente na primeira semana pós-natal e passam a constituir uma pequena proporção das células marcadas em animais adultos. Outras populações, como as células calretinina e TH positivas, são geradas preferencialmente no adulto. Assim como as diferenças de potencial encontradas na extensão espacial da SVZ, as diferenças temporais revelaram-se intrínsecas através do transplante de progenitores entre animais de idades diferentes (De Marchis *et al.*, 2007). Os neurônios gerados para a camada granular em idade neonatal também diferem daqueles gerados no adulto por possuírem vida muito mais longa e terem baixa reposição (Lemasson *et al.*, 2005). Então de alguma forma o potencial dos progenitores da SVZ é dependente de informações adquiridas durante a vida desta célula. É importante observar que para afirmar que a informação é autônoma da célula e independe do ambiente externo seria necessário mostrar que os sinais presentes nas diferentes idades são diferentes. Assim, uma interpretação alternativa seria a que as células continuam necessitando de sinais ambientais para se diferenciar nos diferentes tipos do BO mas ao longo de suas vidas os caminhos fenotípicos que são ativados por estes sinais se modificam.

1.6- GABA e os neuroblastos da SVZ:

Os neuroblastos migratórios da SVZ e da via migratória rostral (RMS) produzem GABA (Wang *et al.* 2003; Bolteus e Bordey, 2004; Sequerra *et al.*, 2007) e expressam em suas membranas o receptor GABA_A (Stewart *et al.*, 2002). A ativação do receptor GABA_A leva a despolarização da membrana do neuroblasto (Stewart *et al.*, 2002; Wang *et al.* 2003) que por sua vez leva a liberação de GABA (Bolteus e Bordey, 2004). Além da despolarização ativada por GABA os neuroblastos também apresentam despolarizações espontâneas (Liu *et al.*, 2005).

Já os astrócitos que envolvem as cadeias migratórias (Lois e Alvarez-Buylla, 1994) expressam o transportador de GABA de alta afinidade, GAT4 em camundongos (ortólogo de GAT3 em rato), responsável pela recaptação de GABA do meio extracelular (Bolteus e Bordey, 2004). Estes também expressam o receptor GABA_A e são despolarizados por GABA (Liu *et al.*, 2005). A inibição do transportador GAT4 com SNAP5114, um inibidor específico, leva ao aumento da amplitude das respostas induzidas por GABA nestas células (Liu *et al.*, 2005) provavelmente por aumentar o GABA extracelular. A ativação de GABA_A leva à diminuição da proliferação dos astrócitos (Liu *et al.*, 2005). Assim o GABA liberado por um maior número de neuroblastos parece servir como um sinal para os astrócitos produzirem menos destas células. O papel do progenitor intermediário entre estas células (as células C) na regulação da produção de neuroblastos por GABA não é conhecido.

A maior concentração de GABA no meio que envolve os neuroblastos, causada pela inibição da recaptação deste pelos astrócitos, reduz a sua velocidade de migração (Bolteus e Bordey, 2004). Experimentos *in vitro* mostraram que células PSA-NCAM⁺, um marcador de neuroblastos na SVZ (Doetsch *et al.*, 1999), produzidas a partir de neuroesferas de SVZ estriatal tem a sua proliferação diminuída pelo GABA (Nguyen *et al.*, 2003). E a adição do agonista de GABA_A, muscimol, a culturas de fatias de telencéfalo de rato P1, reduz a proliferação de células PSA-NCAM⁺ na SVZ (Nguyen *et al.*, 2003). Como pulsos de 30 minutos de BrdU em ratos pós-natos mostram que a fase S desses neuroblastos acontece preferencialmente na periferia das cadeias, isso é, próximo aos astrócitos que as envolve (Menezes *et al.*, 1998), uma possibilidade seria que há um gradiente crescente de GABA em direção ao centro das cadeias, conforme se afastam dos recaptadores do neurotransmissor, e que esse gradiente seja responsável pela preferência posicional das células em fase S. Assim, a proliferação desses neuroblastos seria também inibida *in vivo* por GABA.

Na SVZ e RMS praticamente todos os neuroblastos migratórios expressam GABA (Bolteus e Bordey, 2004). Porém a expressão de GAD é muito fraca e não está presente em todos os neuroblastos (De Marchis *et al.*, 2004). Dos transportadores de alta afinidade de GABA apenas GAT4 (GAT3 em ratos) é expresso na SVZ de camundongos mais especificamente nos astrócitos (Bolteus e Bordey, 2004). Assim, como os neuroblastos migratórios não possuem o transportador de GABA e apenas uma subpopulação dessas células expressa fracamente GAD é possível que essas células produzam GABA a partir de outro precursor, diferente do glutamato.

A síntese de GABA de uma fonte alternativa que utiliza putrescina como precursor foi primeiro descrita em bactérias (Jakoby e Fredericks, 1959). Após isso, outros grupos

mostraram que pode haver a formação de GABA de putrescina também no sistema nervoso central de vertebrados (Seiler e Al-Therib, 1974; de Mello et al., 1976). Na retina em desenvolvimento, a camada neuroblástica apresenta imunoreatividade para GABA mas não para GAD. Da mesma forma, a imunoreatividade de GABA precede a de GAD nas camadas de células ganglionares e nuclear interna na retina de rato em alguns dias (Hokoç et al., 1990). Além disso, a síntese de GABA de putrescina mostrou-se responsável pelo GABA retiniano antes do início da expressão de GAD. Supõem-se que a síntese de GABA por GAD substitui essa via à medida que o tecido madura e os níveis de putrescina decrescem (de Mello et al., 1976; Sobue e Nakajima, 1977; Hokoç et al., 1990).

Assim uma possibilidade a ser testada é a de que a expressão de GABA *per se* durante a fase de progenitor e após a diferenciação em neurônio GABAérgico sejam eventos independentes. Por serem independentes, a síntese de GABA por progenitores não indicaria que estes estão comprometidos com o fenótipo GABAérgico.

2-Objetivos

2.1- *Objetivo Geral*

- Determinar as possíveis fontes de GABA para as células da SVZ.
- Avaliar a função do GABA de putrescina para a biologia das células da SVZ.
- Testar o comprometimento das células da SVZ com o fenótipo GABAérgico.

2.2- *Objetivos Específicos*

- Observar se as células da SVZ são capazes de utilizar putrescina e/ou glutamato para sintetizar GABA.
- Identificar se as células da SVZ são capazes de produzir sua própria putrescina e se existem outras possíveis fontes próximas.
- Testar a importância do GABA de putrescina sobre fenômenos como proliferação, migração e a expressão de GAD na SVZ pós-natal.
- Avaliar o comportamento fenotípico das células da SVZ pós-natal quando confrontado com um ambiente diferente, representado aqui por fatias de telencéfalo embrionário
- Caracterizar se células GABAérgicas e glutamatérgicas são geradas de um explante de SVZ pós-natal co-cultivado com uma fatia de telencéfalo embrionário.

3- Materiais e Métodos

Utilizamos neste estudo hamsteres (*Mesocricetus auratus*), camundongos (*Mus musculus*) suíços e camundongos transgênicos para eGFP (linhagem BCF1 misturada com C57BL/6J preto cedidos por Okabe et al., 1997), e ratos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, criados no biotério do Depto. de Anatomia/UFRJ com água e ração *ad libitum*.

3.1- Ensaio de conversão de putrescina em GABA

Nos experimentos realizados para verificar se a síntese de GABA poderia ocorrer pela via de putrescina em células da SVZ pós-natal foram utilizados ratos no sexto dia pós-natal (P6). Os ratos foram anestesiados profundamente com éter e decapitados. Os encéfalos foram dissecados e o telencéfalo fatiado a 400µm em solução salina de Gey (GBSS, do inglês Gey's basal salt solution) gelada. Os explantes de SVZ foram dissecados das fatias que continham toda a extensão rostral da SVZ/RMS até o bulbo olfatório inclusive.

Para determinar se as células da SVZ destes animais são capazes de converter putrescina em GABA cultivamos os explantes de SVZ em placas não aderentes durante 24h (5% CO₂ à 37°C) em 200µL de meio DMEM F12 com soro fetal bovino a 10% contendo 7µCi de H³-putrescina (NEN) e 7µl de uma solução 300mM de GABA não marcado (Sigma). O GABA não marcado tem a função de diminuir o H³-GABA degradado ou.

Após a cultura, o material citoplasmático foi extraído em 300µL de ácido perclórico (PCA) e foi submetido a choques térmicos três vezes com congelamento em freezer -20°C e

banho maria 40°C. Foram adicionados 400µL de cloreto de dansila (0,03g/mL em acetona) a esse extrato para a marcação fluorescente dos compostos aminados. À esta solução foram adicionados 20mg de carbonato de sódio para neutralizar o PCA. A reação com a dansila foi incubada durante a noite.

Na manhã seguinte, foram adicionados 100 µL de solução de prolina (100mg/mL) para neutralizar a dansila por competição. Os compostos dansilados foram então separados com a adição de 500µL de benzeno. Deste volume foram retirados 100 µL para a realização da cromatografia de camada fina (TLC). A fase móvel foi composta por 85% benzeno, 15% ciclohexanol e 3% metanol. Resumidamente, a amostra foi gotejada na placa (Merck do Brasil) na origem de corrida de 10 em 10µL e a sua absorção auxiliada por ventilação. Após isso a placa foi introduzida em uma câmara de vidro contendo a fase móvel e papel de filtro molhado com este líquido revestindo as paredes. A câmara foi lacrada e a corrida acompanhada através da observação da linha de frente do líquido subindo. Após a incubação, a banda de GABA assim como a origem de corrida (que possui putrescina e seus derivados, espermina e espermidina) foram adicionadas cada à 30mL de Tolueno-PPO-POPOP e a leitura do *tritium* realizada em cintilador (1600TR Packard). A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

3.2- Atividade da decarboxilase da ornitina (ODC)

Com este ensaio procuramos definir as fontes de putrescina para as células da SVZ através da atividade da enzima que converte ornitina em putrescina, a ODC. Os explantes de SVZ foram obtidos como no ensaio de conversão de putrescina em GABA. Neste ensaio também utilizamos explantes de bulbo olfatório. Após a dissecação, o máximo de volume de GBSS foi removido e os explantes congelados a -20°C.

Após o descongelamento, os explantes foram ressuspensos em 150µl de tampão de ODC. As membranas celulares foram rompidas com um único choque térmico seguido de homogeneização mecânica. Dessa solução 50 µl foram retirados e incubados na presença de 0,1µCi de ornitina C¹⁴ e mais 100µl de tampão de ODC a 37 °C por uma hora.

Após a incubação, a reação foi neutralizada com a adição de 200µl de PCA 6%. Para reduzir o CO₂ liberado foram então adicionados 300µl de hidróxido de benzotona (1M em metanol) a um recipiente de plástico ligado à rolha e incubado 30 minutos à 37 °C.

Após a incubação a solução de hidróxido de hiamina foi adicionada à 30mL de Tolueno-PPO-POPOP e a leitura do C¹⁴ realizada em cintilador (1600TR Packard). A dosagem de proteínas foi feita com o método de Lowry e colaboradores (1951).

3.3- Inibição in vivo da síntese de putrescina

Nesse ensaio utilizamos ratos P6 porque havíamos mostrado que as células da SVZ captam putrescina e sintetizam GABA nessa idade (Sequerra et al., 2007). Esses ratos recebem

injeções intraperitoneais (i.p.) diárias (500mg/Kg) de DFMO (Calbiochem, a partir de uma solução aquosa 91,05g/L) durante 9 dias, até P14. Em P15, décimo dia, os animais foram transcardiacamente perfundidos com solução salina (0,3M) seguida de solução tamponada de paraformaldeído 4%.

3.4- Dosagem de putrescina no cerebelo

Um rato tratado com DFMO e um controle não tratado foram anestesiados com éter e decapitados. Os encéfalos foram dissecados e os cerebelos foram removidos.

O material citoplasmático dessas células foi extraído em 300µl de ácido perclórico (PCA) 6% e com três sessões de choque térmico em refrigerador (-20°C) e banho Maria 40°C. Foram adicionados 400µl de cloreto de dansila (0,03g/mL em acetona). A esta solução foram adicionados 20mg de carbonato de sódio para neutralizar o PCA. A reação com a dansila foi incubada durante a noite. Na manhã seguinte, foram adicionados 100 µl de solução de prolina (100mg/mL) para neutralizar a dansila por competição. Os compostos dansilados foram então separados das proteínas com a adição de 500µl de benzeno. Desses 500µl em benzeno, 100 µl foram utilizados no plaqueamento para cromatografia de camada fina (TLC). A fase móvel era composta por 85% benzeno, 15% ciclohexanol e 3% metanol. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). A dosagem do putrescina foi realizada em fluorímetro ISS PC1 (ISS Inc.)

3.5- Análise do efeito da diminuição dos níveis de putrescina sobre a proliferação da SVZ

Para marcar as células em fase S na SVZ, realizamos uma injeção i.p. de solução de Bromo 2-deoxi 5 uridina (BrdU, solução de 10mg por mL em água, Sigma, 50mg/Kg) 40 minutos antes do sacrifício dos animais. O BrdU é um análogo de timidina que é incorporado ao DNA de células em mitose.

Os encéfalos fixados foram crioprotégidos passando por soluções de concentração crescente de sacarose (10-30%). Esses foram imersos em solução para criosecção OCT (*optimal cutting temperature*, Tissue Tek), congelados utilizando nitrogênio líquido, permitindo depois que o bloco contendo o encéfalo voltasse para a temperatura do criostato (-17 °C) e fatiados coronal e sagitalmente em criostato (Leica) a 20µm. Os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas de vidro geladas que eram então aquecidas à temperatura ambiente.

As secções coronais receberam tratamento ácido para permeabilização das membranas como se segue:

Cortes foram imersos em seqüência em H₂O a 37°C (10min), em HCl 2M a 37°C (por 30 min) 1 em tampão borato (pH= 8,5, 0,5M) a 37°C (10 min). Em seguida as lâminas eram lavadas com salina com tampão fosfato (PBS; 0,1M; do inglês phosphate buffer saline) por 3 vezes.

Após este pré-tratamento, as fatias foram incubadas com uma solução de bloqueio com 5% de NGS (Vector) durante 30 minutos. Logo após foi incubado com anticorpo anti-BrdU (Amershan, 1:2) durante uma noite. Após três lavagens com PBS, foi colocado sobre os cortes na lâmina a solução contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo

conjugado ao fluoróforo Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:800). Após lavagem com PBS as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando N-propil galato (Vetec, 50g/L sendo 200mL tampão fosfato 0,1M e 800mL glicerol) como meio de montagem.

As imagens foram capturadas em microscópio invertido de fluorescência Eclipse TE200 (Nikon) conectado a uma câmera *CoolSnap* dotado de um conjunto de filtros para rodamina, fluoresceína e DAPI. Utilizamos para a captura e análise das imagens o software Image Pro (Nikon). Para a quantificação, estabelecemos um perímetro à 200µm de distância da luz ventricular e todas as células BrdU positivas dentro deste perímetro foram contadas. Foram utilizadas fatias nos dois grupos experimentais (tratado com DFMO e não tratado) em posição equivalente no eixo rostro-caudal em relação a marcos topográficos como a posição da comissura hipocampal, formato da comissura anterior e do ventrículo lateral. O teste estatístico utilizado foi o teste t com o auxílio do software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.).

3.6- Cultura de explantes de SVZ pós-natal

Os encéfalos de ratos P6 foram cortados parassagitalmente a 350 µm em um fatiador de tecidos (Tissue chopper - McIlwain) e as fatias obtidas eram separadas no interior do fluxo laminar e novamente imersas em GBSS, onde permaneciam por 30 minutos a 4 °C, com o intuito de inibir a ação de proteases. Após este período, as fatias eram transportadas para o interior do fluxo, de modo a permitir a dissecação da zona subventricular. Nós dissecamos explantes da SVZ adjacente ao BO pois esta é bem evidente em P6 e passíveis de dissecação sem contaminação (Fig. 4). Após a obtenção dos explantes de SVZ, os mesmos eram plaqueados sobre lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina

(0,1mg/mL) por 40 minutos em placas de cultura de 4 poços (NUNC). Estes explantes foram então cobertos com uma fina camada de Matrigel (extrato de membrana basal solúvel de tumor Engellbreth-Holm-Swarm,.Becton-Dickinson) diluído em meio Neurobasal (Gibco), numa concentração 1:3 (este procedimento foi feito com Matrigel mantido em gelo, forma em que fica em estado líquido). Após um período de 5 minutos na estufa a 37°C, tempo suficiente para que o Matrigel adquira uma consistência mais gelatinosa, cada poço era preenchido com meio Neurobasal (Gibco) suplementado de B-27 (Invitrogen) e os explantes foram mantidos por 48h na estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

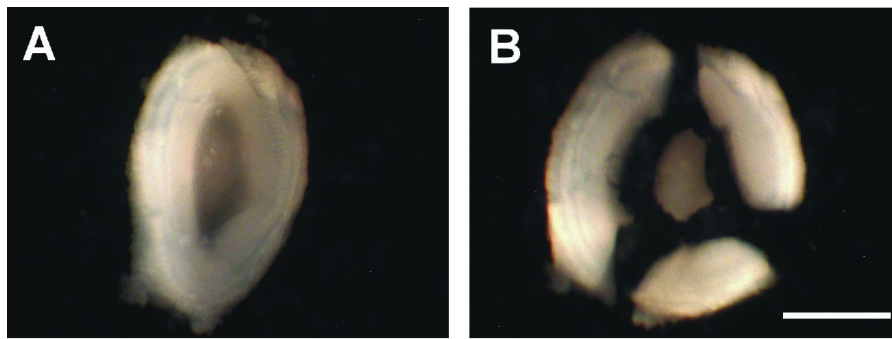


Figura 4- Dissecção de explantes de SVZ. (A) Neste procedimento foram realizados cortes coronais (400µm) da região compreendendo o BO de ratos P6. A região mais translúcida no centro da fatia representa a SVZ na região da RMS. A foto em B mostra a fatia após a dissecção do explante de SVZ (ao centro) e os explantes de BO. Barra de calibração 1mm.

3.7- Ensaio sobre a plasticidade fenotípica de células da SVZ

Para abordar a questão da influência das pistas ambientais sobre as células da SVZ foi desenvolvido um ensaio onde a intenção era colocar as células da SVZ pós-natal em contato com a VZ de fatias embrionárias, e verificar os limites da plasticidade destas células em relação a seu comportamento migratório e fenótipos normais.

Foram usados como hospedeiros hamsters com 13 dias embrionários (E13, sendo o dia de concepção dito E1), pois nessa idade estão em plena neurogênese (Lent et al., 1990) e em pleno período de migração no córtex cerebral (Shimada e Langman, 1970). Além disso, o casal de hamsters só precisa conviver uma hora durante o acasalamento enquanto camundongos precisam de uma noite para o seu acasalamento. Assim, a datação da idade dos embriões de hamster é muito mais precisa. Camundongos GFP com idades entre o décimo e o décimo segundo dia pós-natal (P9-P11, sendo o primeiro dia considerado P0) foram usados como doadores da SVZ pois no fim da primeira semana pós-natal a SVZ é proeminente e de fácil dissecação e não há mais neurogênese a partir da VZ nesta idade (Smart and Smart, 1982). Além disto, a migração celular no córtex cerebral está predominantemente terminada (Shimada e Langman, 1970; Bandeira, 2000, tese de mestrado).

A abordagem experimental utilizada foi a colocação de explantes de SVZ de camundongos transgênicos expressando GFP constitutivamente, justapostos à superfície ventricular de fatias coronais de telencéfalo embrionário (Fig. 5)

3.8- Procedimentos para a preparação de co-culturas de fatias organotípicas e explantes de SVZ de animais transgênicos para eGFP

Para obter hamsteres embrionários, cada fêmea grávida recebeu uma injeção intraperitoneal de Cloropentobarbital (60mg/mL pentobarbital sódico, 0,042mg/mL hidrato de cloral) à dosagem de 3,5mL/kg acrescida de 30% do volume após 5 minutos, e os fetos foram retirados através de intervenção cesária e decapitados. Os cérebros foram dissecados mergulhados em GBSS gelada dentro de fluxo laminar horizontal. Após a cesariana as

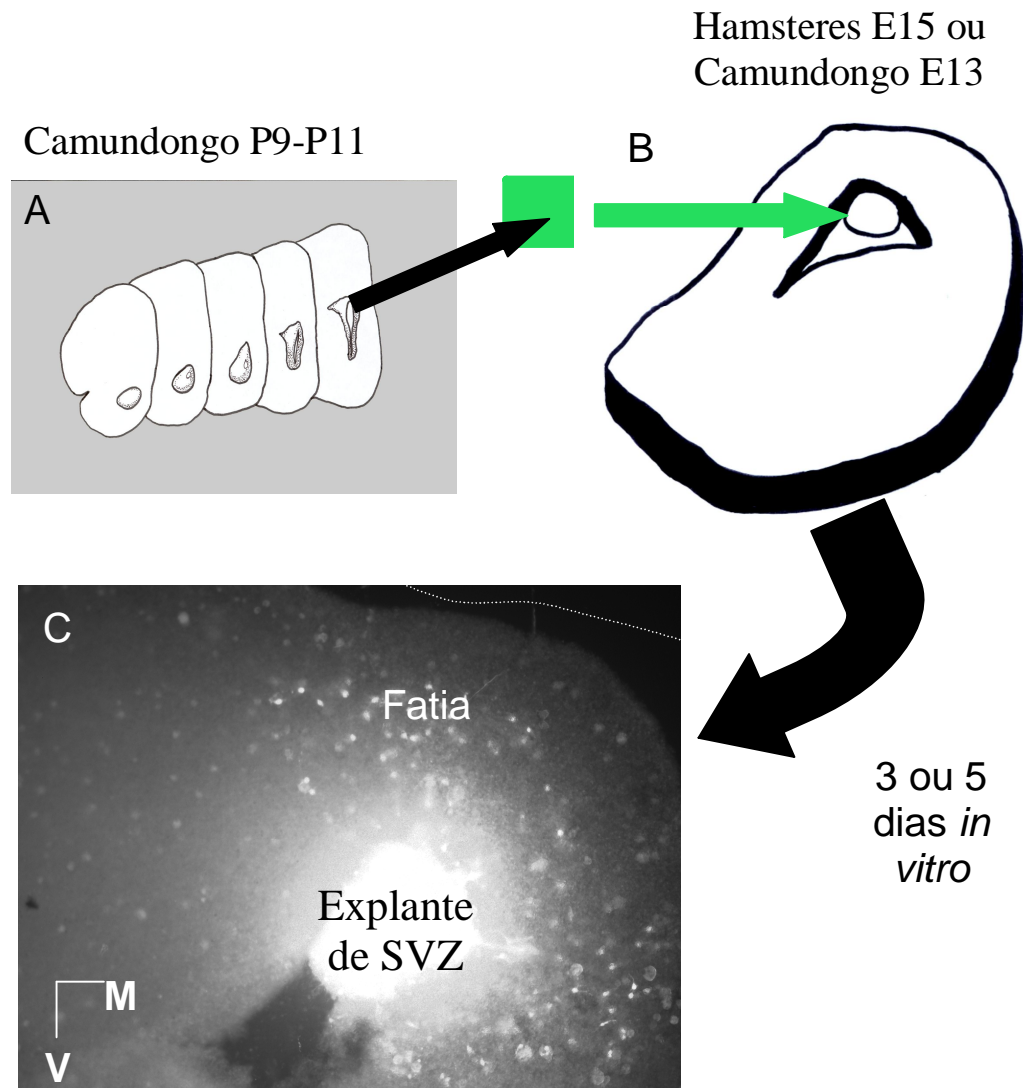


Figura 5. Co-cultura de fatias de telencéfalo embrionário e explantes de SVZ. Fatias coronais de telencéfalo a 350µm obtidas de camundongos β -actina/eGFP foram preparadas (esquema em A) e destas explantes de SVZ foram dissecados. Fatias de telencéfalo embrionário de hamsters em E15 ou camundongos em E13 foram plaqueadas e um explante de SVZ posicionado tocando a superfície ventricular dorsal de cada fatia (esquema em B). (C) Fotomicrografia de fluorescência mostrando o explante de SVZ eGFP positivo posicionado tocando a superfície ventricular dorsal de uma fatia de telencéfalo embrionário sem fluorescência. As células fluorescentes encontradas na fatia migraram a partir do explante.

fêmeas foram sacrificadas com uma dose letal de anestésico. A manutenção da vida da fêmea não é possível por estes animais não aceitarem procedimentos de sutura abdominal.

Os cérebros eram então fatiados coronalmente a 350 μ m, em fatiador de tecidos, e as fatias dos dois terços mais rostrais do córtex cerebral eram separadas. Estas eram então plaqueadas em membranas hidrofílicas permeáveis a gases (Petriperm-PolyLabo) pré-tratadas com poli-L-lisina (0,1mg/mL, Sigma, no mínimo 40 minutos antes). O meio de cultura, composto por Solução Salina de Hank (Gibco) a 30%, Soro Fetal Bovino (Gibco) a 10%, penicilina-estreptomicina (Gibco) a 1%, fungizon (Bristol-Meyer Squibb, Brasil) a 1% em DMEM-F12 (Gibco), era vertido na placa de cultura até cobrir as fatias.

Culturas organotípicas de córtex cerebral quando plaqueadas nessas condições formam uma camada sobre a placa de cultura através do crescimento organizado após, no mínimo, 3 a 4 dias, camada esta que resulta da extensão de glia radial da fatia para a placa de cultura e da migração de precursores neuronais da zona ventricular cortical e de outras regiões telencefálicas (para descrição detalhada, ver Hedin-Pereira et al., 2000). Essa camada fina de células facilita a visualização de células individuais e de suas interrelações com outras células. A neocamada, como foi chamado este crescimento a partir da fatia, é especialmente vantajosa para se detectar a migração gliofílica de forma inequívoca, visto que é possível isolar-se as fibras gliais com perfis neuronais migratórios apostos a elas e por isso escolhemos as placas Petriperm neste ensaio.

As fatias eram deixadas durante a noite para que a sua total adesão ocorresse. Na manhã seguinte, foi realizada a decaptação de camundongos transgênicos em P9. Esses animais expressam constitutivamente o gene da proteína fluorescente verde (GFP- "green fluorescent protein") que está sob regulação do promotor da actina e de um "enhancer" de

citomegalovírus e o promotor do gene da β -actina (Okabe *et al.*, 1997). Os cérebros foram então retirados e fatiados para a realização da dissecação da SVZ. A SVZ dissecada foi então cortada em explantes que foram plaqueados na luz do ventrículo das fatias de hamsters E15 tocando a superfície ventricular abaixo do neocórtex.

Após 3 ou 5 dias *in vitro* (3DIV) as culturas eram fixadas por 15 minutos em vapor de formol e imersas por 7 minutos em paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). As fatias que foram processadas para glutamato foram fixadas também com glutaraldeído 0,5% na mesma solução de PFA 4%.

3.9- Imuno-histoquímica das coculturas de telencéfalo embrionário e explantes de SVZ pós-natal

As placas Petriperm foram cortadas ao redor das fatias com o auxílio de um bisturi. As fatias foram então colocadas em placas de quatro poços (NUNC) contendo PBS.

As fatias foram então bloqueadas para reações inespecíficas do anticorpo com o tecido através da incubação por 15 minutos com uma solução de PBS e soro de cabra normal 5% (Invitrogen). Após o bloqueio as fatias foram incubadas com um destes anticorpos listados a seguir: glutamato (Chemicon, 1:250), GABA (Sigma, 1:2000), GFAP (Dako, 1:400) feitos em coelho. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em PBS Triton 0,3%. Os anticorpos primários foram deixados por 3 dias de incubação com exceção do anti-GFAP que foi incubado durante uma noite. Após incubação as culturas foram lavadas três vezes e então incubadas por duas horas em anticorpo secundário cabra anti-coelho conjugado ao fluoróforo Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:800).

3.10- Análise e edição de imagens:

As imagens produzidas em microscópio confocal LSM 510 (Zeiss) foram editadas no software LSM Image Browser. Neste foram realizados cortes ortogonais, empilhamento (*Stack*) de diversos cortes óticos e edição do brilho e contraste.

As imagens produzidas no microscópio de fluorescência TE200 (Nikon) foram analisadas com o software ImagePro (Media Cybernetics). No ensaio de migração na presença de GABA os alos migratórios foram determinados e medidos com o auxílio do programa assim como a medição da maior distância. No ensaio de proliferação nos animais tratados com DFMO o perímetro de 200µm ao redor do ventrículo foi produzido com auxílio do programa. A sobreposição das fotos do ventrículo lateral foi feita com auxílio do software Photoshop CS2 (Adobe).

A estatística de todos os resultados quantitativos foi analisada com auxílio do software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.).

4-Resultados

4.1-Via de síntese de GABA pelas células da SVZ

Os neuroblastos da SVZ começam a expressar GABA ainda ao redor dos ventrículos laterais (Bolteus e Bordey, 2004; Fig. 6F) e essa expressão continua ao longo de toda a RMS até a camada granular do BO (Fig. 6A-E). A expressão de GABA nos neuroblastos da SVZ pode ser evidenciada através de sua co-localização com o marcador β -tubulina de classe III (através do uso do anticorpo Tuj1; Fig.6C-E). A intensidade da expressão de GABA nos neuroblastos da SVZ é menor que aquela apresentada pelos neurônios GABAérgicos do BO (Fig. 6B). Esta diferença pode resultar do pequeno volume de citoplasma frente ao volume nuclear dos neuroblastos.

Para verificar se os neuroblastos da SVZ contém a maquinaria bioquímica típica de neurônios GABAérgicos diferenciados analisamos a expressão da enzima de síntese do GABA, a descarboxilase do ácido glutâmico. A expressão de GAD por imunohistoquímica em cortes parasagittais de ratos P6 foi realizada utilizando o anticorpo que reconhece as duas isoformas de GAD, a 65 e a 67 (Oertel et al., 1981). Detectamos forte expressão de GAD nos glomérulos, nas células periglomerulares, na camada granular e nas projeções das células granulares sobre as camadas plexiforme externa e interna (Fig. 7A, B). Como esperado, o córtex cerebral também revelou populações de células expressando a enzima (Fig. 8A e C) consistente com a existência nesta idade de neurônios GABAérgicos diferenciados. Constatamos, no entanto, que a SVZ não apresenta níveis detectáveis de

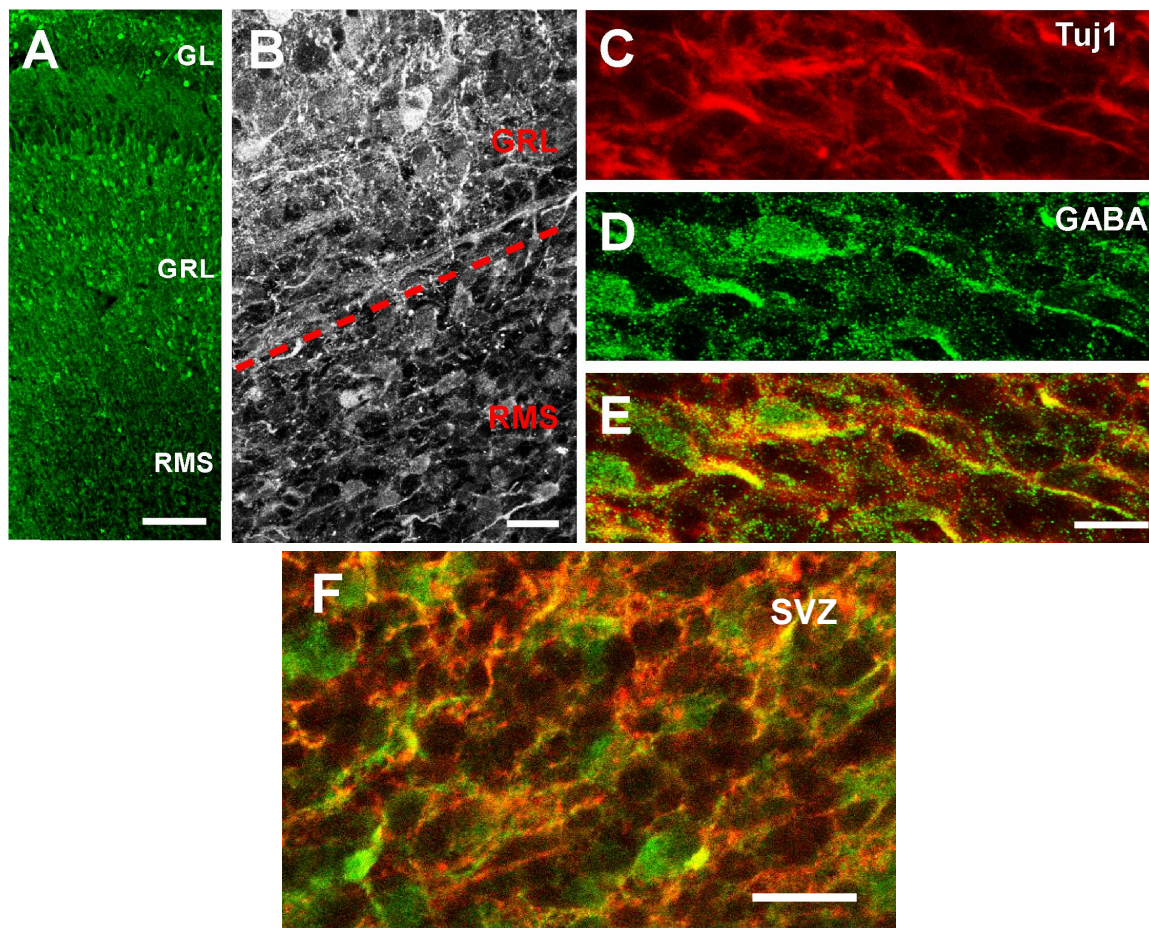


Figura 6. Expressão de GABA nos neuroblastos da SVZ e bulbo olfatório. (A) Padrão da expressão de GABA nas diferentes camadas do bulbo olfatório. (B) Células da SVZ e GL expressam GABA detectado por imunohistoquímica, as primeiras em menor intensidade que as segundas. Note a morfologia migratória das células GABAérgicas. As células marcadas pelo anticorpo Tuj1 (C) também são marcadas para anti-GABA (D e E) indicando que estas células GABAérgicas são neuroblastos. Esse padrão de marcação é comum a regiões mais caudais como a SVZ anterior (SVZa). GL: camada glomerular; GRL: camada granular; RMS: via migratória rostral, SVZa: zona subventricular anterior. Barras de calibração: A=200µm, B=20µm, E=10µm e em F=20µm.

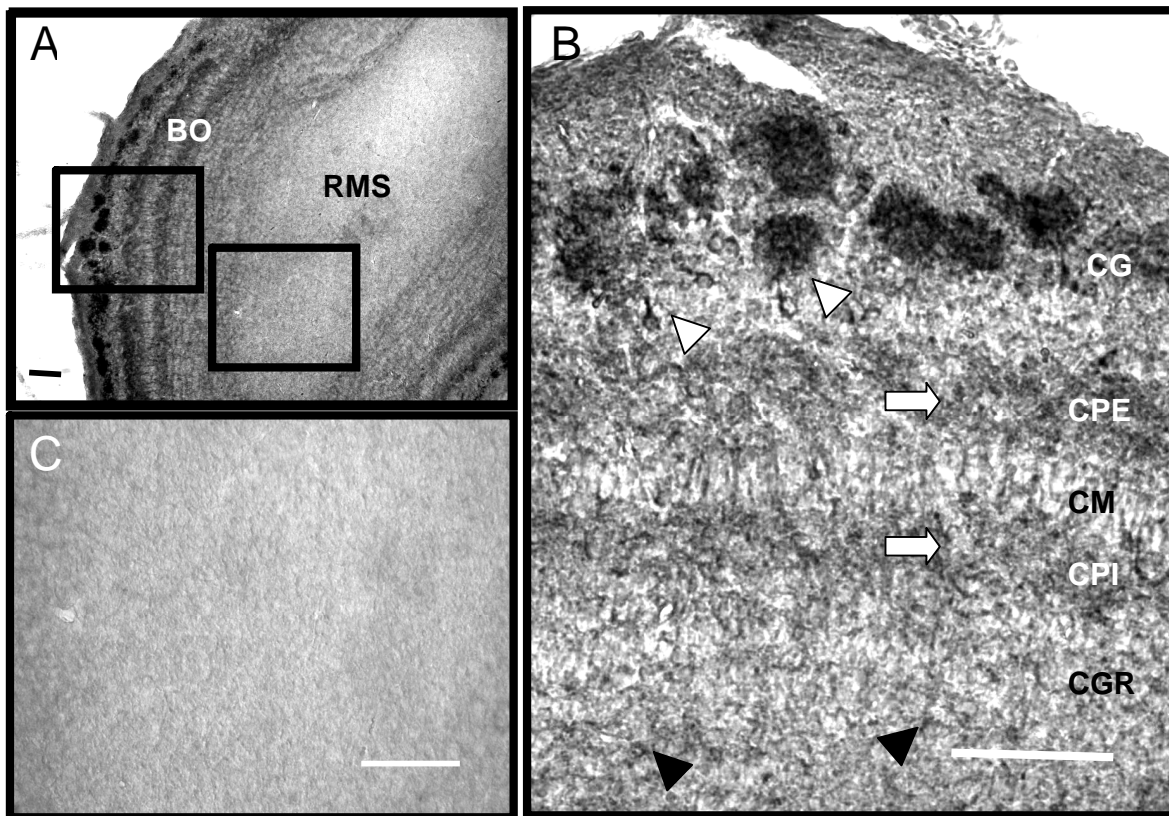


Figura 7. Expressão de GAD em diferentes regiões do telencéfalo de ratos no sétimo dia pós-natal. (A) O bulbo olfatório (BO) apresenta forte imunoreação para GAD mas esta está ausente da extensão rostral da SVZ, a RMS. (B) Maior aumento do retângulo esquerdo em A mostrando que o BO apresenta marcação em quase todas as suas camadas. A expressão de GAD inclui a neurópila dos glomérulos e corpos celulares periglomerulares (cabeça de seta branca), a neurópila das camadas plexiforme interna e externa (seta branca) e camada granular (cabeça de seta preta). (C) Maior aumento do retângulo da direita em A mostrando marcação de fundo e a inexistência de perfis celulares marcados tornando evidente que a SVZ não marca para GAD. BO: bulbo olfatório, RMS: via migratória rostral, CG: camada glomerular, CPE: camada plexiforme externa, CM: camada de células mitrales, CPI: camada plexiforme interna, CGR: camada de células granulares. Barra de calibração em A, B, C= 100µm.

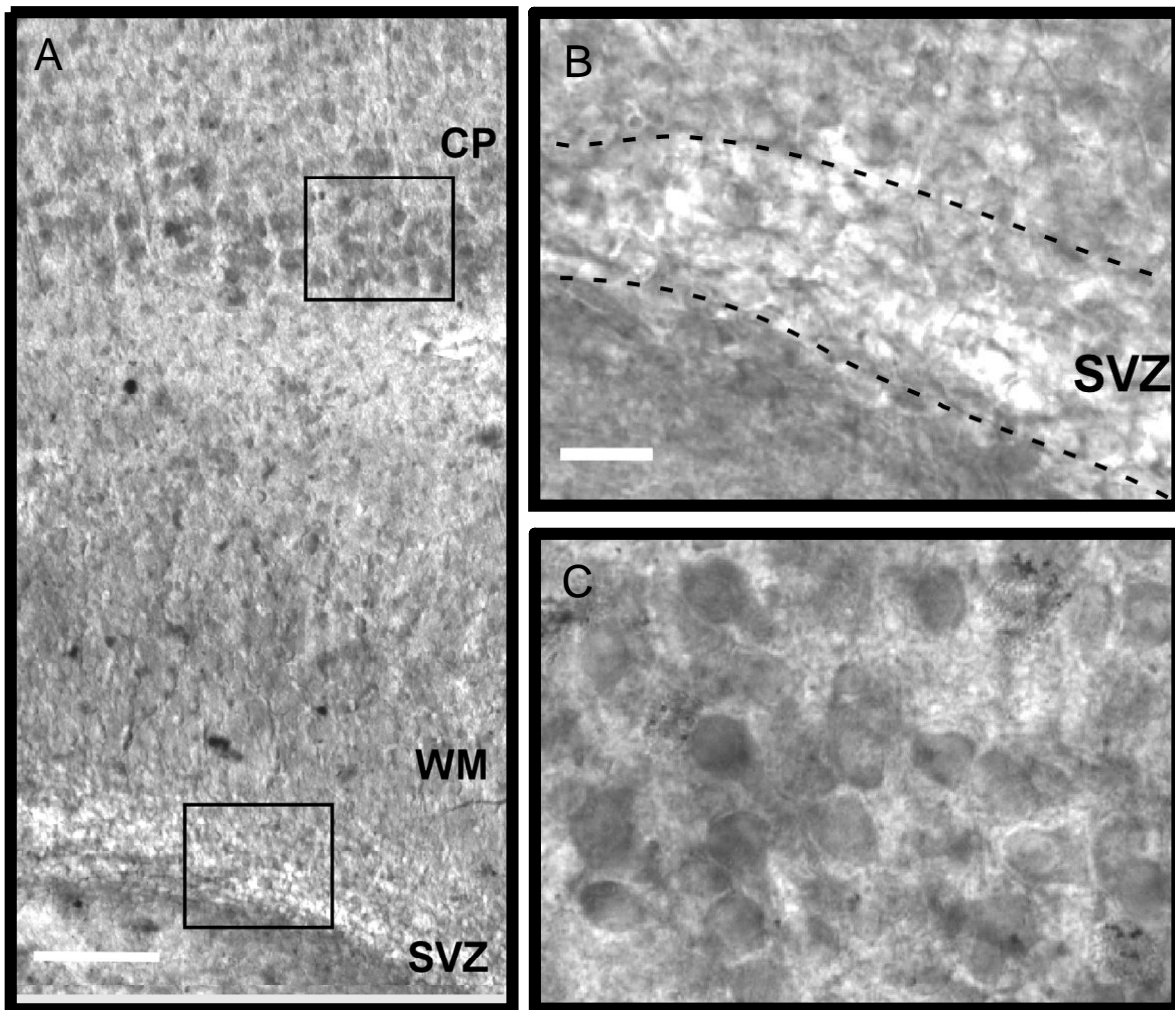


Figura 8. Expressão de GAD na SVZ dorsal adjacente ao ventrículo lateral. (A) Expressão de GAD em regiões adjacentes a SVZ mais caudal. (B) Maior aumento do retângulo inferior em A mostrando que a SVZ não possui células GAD positivas. (C) maior aumento do retângulo superior em A mostrando células GAD positivas na camada VI cortical. CP: placa cortical, SVZ: zona subventricular, WM: substância branca. A= 100 μ m, B= 20 μ m.

imunoreatividade para GAD tanto ao redor dos ventrículos laterais quanto ao longo de toda a RMS até o BO (Fig. 7A e C; Fig.8 A e B).

Para nos certificarmos de que GAD realmente está ausente da SVZ apesar da presença de GABA, decidimos utilizar um método mais sensível para a sua detecção - a medição da sua atividade enzimática na conversão de glutamato em GABA. Para isso, dissecamos a região da SVZ que compreende o ramo horizontal da RMS. Essa região foi escolhida por ser proeminente em P6 minimizando a contaminação por regiões vizinhas. Esses explantes tiveram o seu conteúdo citoplasmático extraído por choque térmico e incubado na presença de L-glutamato C^{14} por 1 hora a $37^{\circ}C$. A atividade de descarboxilase é medida através da captura de C^{14} liberado em uma solução redutora do CO_2 . Os explantes de SVZ apresentaram alguma atividade de descarboxilação do glutamato (Tabela 1). No entanto, quando comparados aos níveis de atividade de explantes de BO, os explantes de SVZ possuem pouco menos da metade da atividade de GAD por mg de proteína. Assim, a expressão de GABA na SVZ deve-se parcialmente a uma atividade basal de GAD. A GAD presente na SVZ não se encontra em níveis detectáveis por imunohistoquímica.

Tabela 1: Atividade GAD na SVZ e BO

Tecido	nmol de CO_2 /h/mg de proteína
Bulbo olfatório	$18,65 \pm 1,9$ (3)
Zona Subventricular	$8,96 \pm 1,2$ (4)**

Tabela 1. O conteúdo citoplasmático dos explantes foi incubados com $25\mu Ci$ de L-[U- C^{14}] glutamato por 1h a $37^{\circ}C$. O montante de CO_2 C^{14} liberado foi então medido em cintilador. Os dados representam a média \pm o erro padrão. ** significa $P < 0,01$ (teste t não pareado)

4.2- Células da SVZ sintetizam GABA a partir de putrescina

Tendo verificado que a expressão de GAD detectada por imunohistoquímica e bioquímica não parece justificar o conteúdo de GABA nos neuroblasto da SVZ, resolvemos testar se estes podem sintetizar GABA a partir de putrescina. A via de conversão de putrescina em GABA foi descrita previamente no desenvolvimento retiniano (de Mello et al., 1976). Para isso dissecamos explantes da SVZ de ratos P6 (como descrito acima), e os colocamos em cultura não aderente na presença de H^3 putrescina. Após 24 horas estas células foram rompidas com choque térmico e os compostos aminados marcados com cloreto de dansila que os torna fluorescentes. Corremos uma cromatografia de camada fina (TLC) para separar o por sua solubilidade na fase móvel e a banda resultante foi removida da placa (por raspagem), solubilizada em líquido de cintilação, e sua radioatividade medida. Comparando a quantidade de *tritium* encontrada na banda de GABA em relação à banda que permaneceu na origem de corrida, que possui putrescina e seus derivados, spermina e spermidina, observamos que aproximadamente 30% da putrescina que foi captada foi utilizada na síntese de GABA. Assim, a expressão precoce de GABA por neuroblastos da SVZ é também explicada pela síntese a partir de putrescina.

Tabela 2: Conversão de putrescina em GABA por células da SVZ

Radioatividade total recuperada (banda de GABA mais a de poliaminas; cpm)	3546 ± 121
Radioatividade na banda de GABA (cpm)	1050 ± 146
Porcentagem de tritium ligado a GABA	$29,73 \pm 3,01$

Tabela 2: Explantes de SVZ foram cultivados em meio contendo $7\mu\text{Ci}$ de H^3 putrescina. Após 24 h o material citoplasmático foi liberado, o GABA foi separado e o tritium medido em cintilador. A média está mostrada junto com o erro padrão, $n=3$.

4.3-Identificação da fonte de putrescina da SVZ

Para verificar se as células da SVZ ou de tecidos circunjacentes são fontes endógenas de putrescina analisamos nestas células a atividade da enzima de síntese de putrescina, a ornitina descarboxilase. Para isto, explantes de SVZ e de bulbo olfatório foram rompidos com homogeneização mecânica e o sobrenadante foi incubado na presença de C^{14} ornitina a 37°C . A enzima de síntese de putrescina, a ornitina descarboxilase (ODC), remove um C^{14} da ornitina. Logo para cada molécula de C^{14}CO_2 espera-se encontrar uma molécula de putrescina. Assim o CO_2 liberado da solução durante uma hora, era reduzido em uma solução acoplada à tampa do tubo, o hidróxido de benzetonina. O C^{14} presente nesta solução era detectado no cintilador. O resultado observado foi que tanto a SVZ como o bulbo olfatório e o plexo coróide possuem atividade de ODC (Tabela 3) e são prováveis fontes de putrescina para células da SVZ.

Tabela 3: Atividade enzimática de ODC em diferentes tecidos:

Tecido	pmol de CO ₂ /h/mg de proteína
Bulbo olfatório	53,7 ± 7,3 (2)
Zona Subventricular	34,3 ± 16,7 (2)
Plexo Coróide	63,0 ± 8,0 (2)

Tabela 3. Os conteúdos citoplasmáticos dos tecidos foram incubados com 0,4μCi de L-[1-C¹⁴] ornitina por 1h a 37°C. A quantidade de CO₂ C¹⁴ liberada foi então medida em um cintilador. Os dados representam a média ± o desvio padrão dos valores individuais da média.

4.4-Papel da putrescina na biologia das células da SVZ

Qual seria a contribuição de GABA de putrescina para o desenvolvimento dos neurônios gerados pós-natalmente na SVZ? Para abordar essa questão, desenvolvemos um ensaio onde ratos pós-natos são tratados com um inibidor irreversível, a di-fluor-metilornitina (DFMO), da enzima de síntese de putrescina, a ornitina descarboxilase (ODC). Para verificarmos a eficácia da administração da droga medimos os níveis de putrescina através da sua marcação fluorescente com cloreto de dansila e medida da sua fluorescência em fluorímetro em dois animais tratados de diferentes ninhadas utilizando o tecido cerebelar como parâmetro. Os animais tratados tiveram uma diminuição nos níveis de putrescina na ordem de 78% em comparação ao controle da mesma ninhada (0,76 contra 3,51 unidades arbitrárias de fluorescência por mg de proteína).

4.5- Efeito subregulação da putrescina sobre a proliferação na SVZ

Já foi mostrado que o GABA tem papel de regulação da proliferação celular na SVZ (Nguyen et al., 2003; Liu et al., 2005). Assumindo que a redução dos níveis de putrescina pode interferir indiretamente na proliferação das células da SVZ uma vez que estas células utilizam essa molécula para produzir GABA (Tabela 2; Sequerra et al., 2007). Para isso realizamos uma injeção intraperitoneal de BrdU (50mg/Kg) 40 minutos antes do sacrifício. Os encéfalos foram então cortados em criostato, imunoreagidos para BrdU e o número de células BrdU positivas na SVZ quantificado como nas Figuras 9A-D. Como o ventrículo pode representar uma fonte de putrescina, já que o plexo coróide sintetiza putrescina (Tabela 3), analisamos separadamente a SVZ ao redor do ventrículo e a sua projeção rostral. Não encontramos uma diferença no número de células BrdU positivas nos dois grupos (Fig.9D e E). Assim, a alteração dos níveis de putrescina não interfere com o número de células no ciclo celular da SVZ.

4.6-Expressão de GABA e GAD na SVZ de animais no modelo de diminuição da putrescina

Uma vez que as células da SVZ produzem GABA a partir de putrescina, partimos para analisar se a expressão de GABA na SVZ era alterada com o tratamento com DFMO. Os animais tratados com DFMO continuam a expressar GABA nesta camada proliferativa (Fig.10). Em uma análise qualitativa, observamos por microscopia confocal que a intensidade da marcação de GABA nos dois grupos é semelhante, utilizando-se os mesmos parâmetros de ganho do detector, nível do laser e abertura do “*pinhole*” (Figura 10A-F).

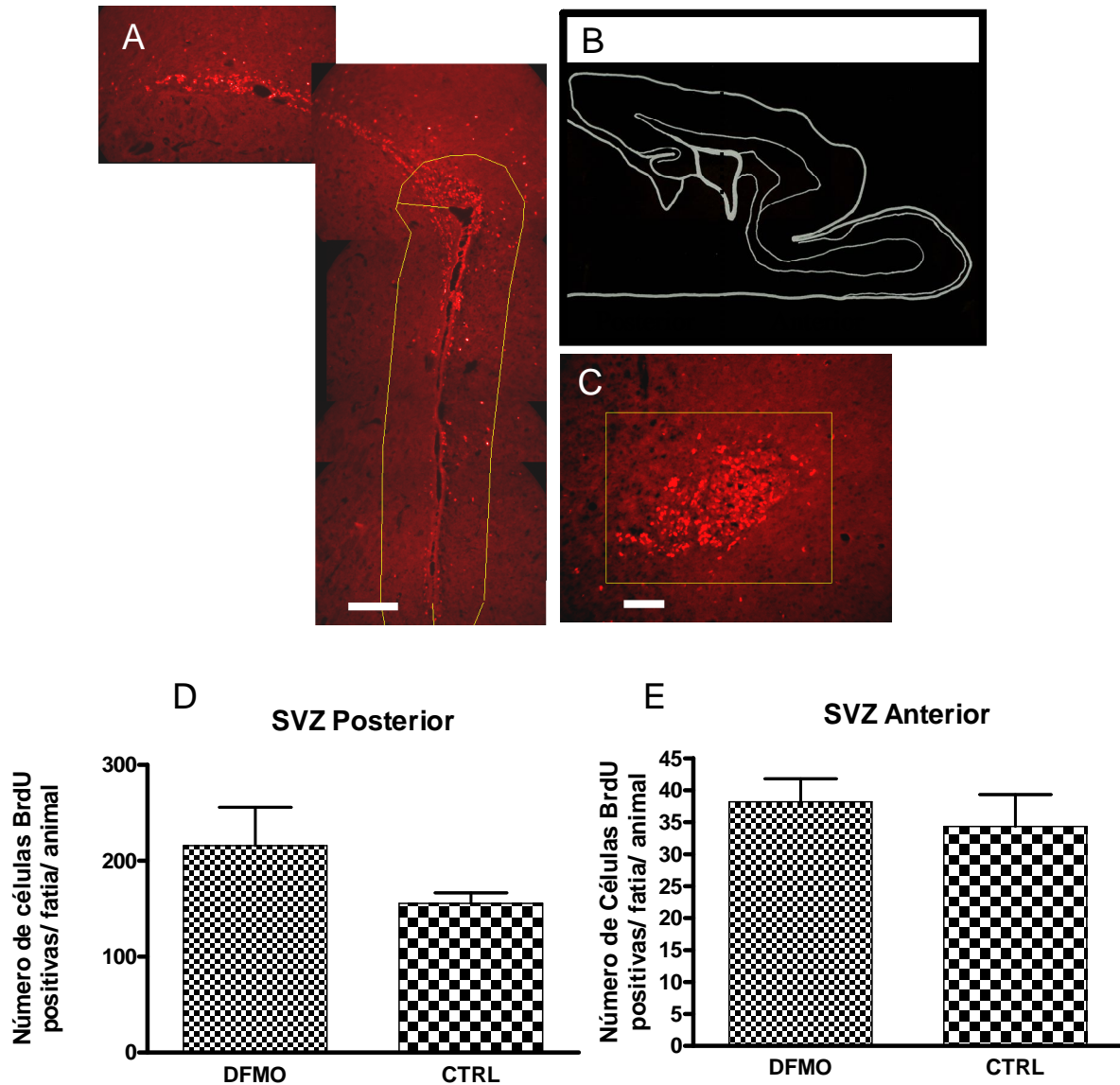


Figura 9. Análise do efeito do tratamento com DFMO sobre a proliferação na SVZ. (A) Exemplo de região da SVZ ao redor do ventrículo cujo corte coronal foi reagido com anti-corpo contra BrdU (vermelho) para detecção de proliferação. Foi desenhado um perímetro (linha amarela) em torno do ventrículo equidistante de suas bordas em 200µm. Este delimita a área a ser analisada. (B) Esquema representando as duas grandes regiões de análise no eixo ântero-posterior. (C) Exemplo de um corte na região anterior da SVZ imunoreagido para revelar o BrdU. (D e E) Quantificação da proliferação na SVZ posterior e anterior respectivamente (teste *t* de *Student*, $P < 0,05$, $n = 3$) não demonstrou diferença entre o grupo tratado e o grupo controle. Barra de calibração em A = 200µm e em C = 100µm.

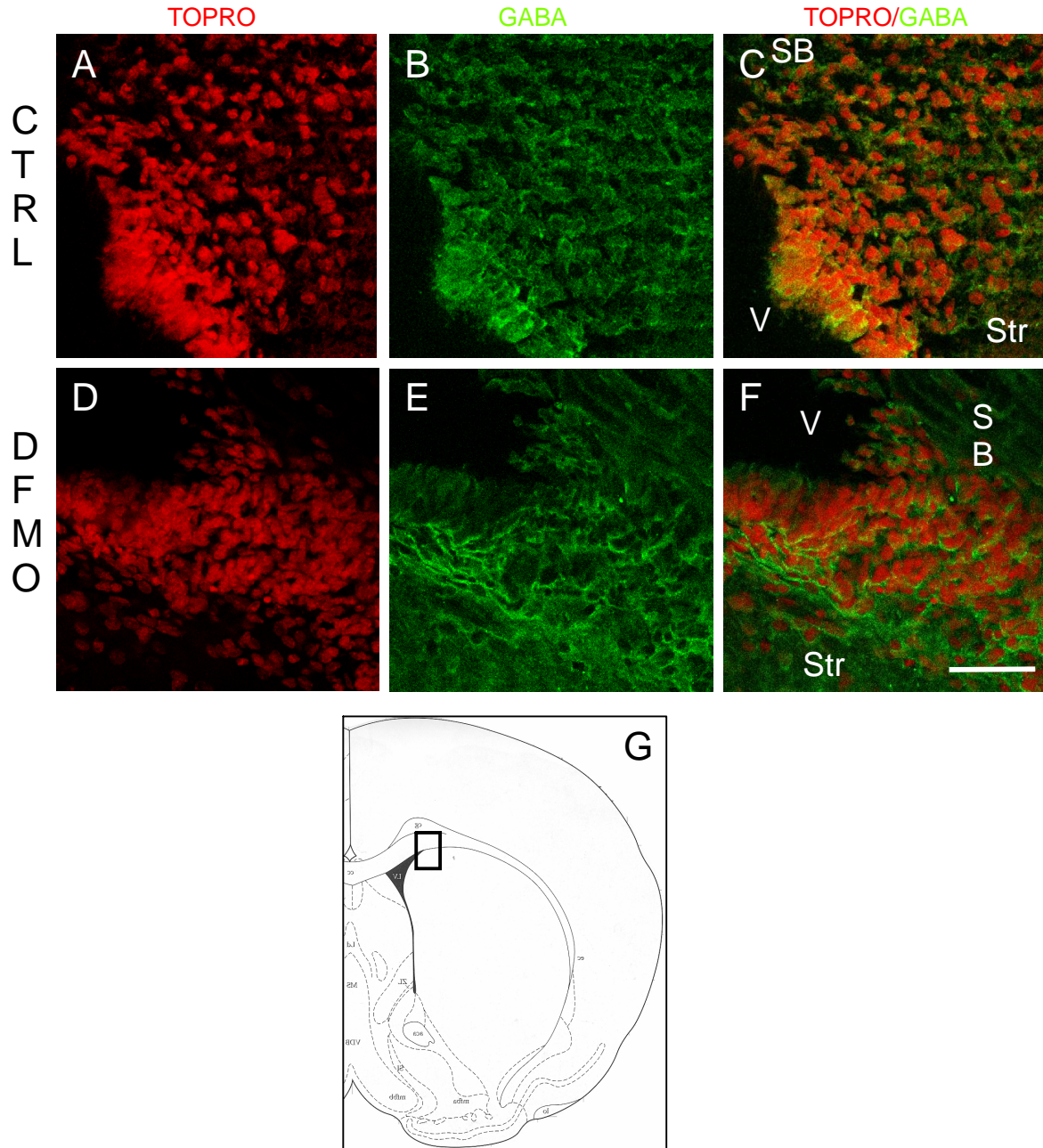


Figura 10. Expressão de GABA na SVZ após tratamento com DFMO é mantida. A, B e C mostram imagens feitas à microscopia confocal da SVZ no local indicado por retângulo na figura G - entre o corpo estriado, a substância branca e o ventrículo lateral do controle. D, E, e F mostram a mesma região em um animal tratado com DFMO. A e D mostram a marcação nuclear com TOPRO. B e E mostram a imuno-marcação de GABA. C e F mostram a dupla marcação GABA/TOPRO. (G) Esquema mostrando corte coronal representando um hemisfério do cérebro do rato. O retângulo mostra a região onde as fotos foram tiradas. Barra de calibração 50µm.

Como diversos grupos já mostraram que GABA pode regular sua própria síntese inibindo a expressão de GAD (de Mello, 1984; Rinvall e Martin, 1992), decidimos analisar qual seria o efeito do decréscimo nos níveis de putrescina sobre a expressão de GAD na SVZ. Realizamos imunohistoquímica para GAD (anti-GAD feito em ovelha) utilizando um anti-ovelha biotinilado e reação com estreptavidina ligada à peroxidase. Observamos que o tecido cerebral de animais tratados com DFMO produziu uma coloração de fundo mais intensa que a de controles sem tratamento (Fig.11) ou sem anticorpo primário. Apesar da marcação de fundo mais intensa, conseguimos discernir claramente corpos celulares marcados por anti-GAD na SVZ ao redor dos ventrículos laterais (Figs. 11C e D). Esta marcação estava ausente nos animais controle não tratados (Figs.11A e B) ou sem anticorpo primário. Especificamente na parede lateral dos ventrículos laterais observamos que células endoteliais dotadas de cílios apresentavam níveis mais baixos de marcação e esta bastante difusa. Não era possível delinear-se claramente um perfil celular como na SVZ (Fig.11D). Consideramos que estas células eram negativas para GAD. Como dito acima, os animais tratados com DFMO possuem células marcadas para GAD claramente diferentes das células endoteliais (Fig.11D). Como a coloração de fundo é mais alta, o tempo de exposição da Figura 11C é menor que o da Figura 11D. As cabeças de seta em 11C representam a posição das células endoteliais através da observação da posição dos cílios na Figura 11C na mesma posição da Figura 11D.

Em fatias mais rostrais, também detectamos a expressão de GAD na SVZ adjacente ao bulbo olfatório (Figs.11G e H) ausente nos animais não tratados (Figs.11E e F). Além do aumento da expressão de GAD na SVZ, observamos que os neurônios granulares que já possuíam marcação para esta molécula nos animais controle (Figs.11I e J) apresentam uma marcação mais intensa nos animais tratados com DFMO (Figs.11L e M). Assim, o

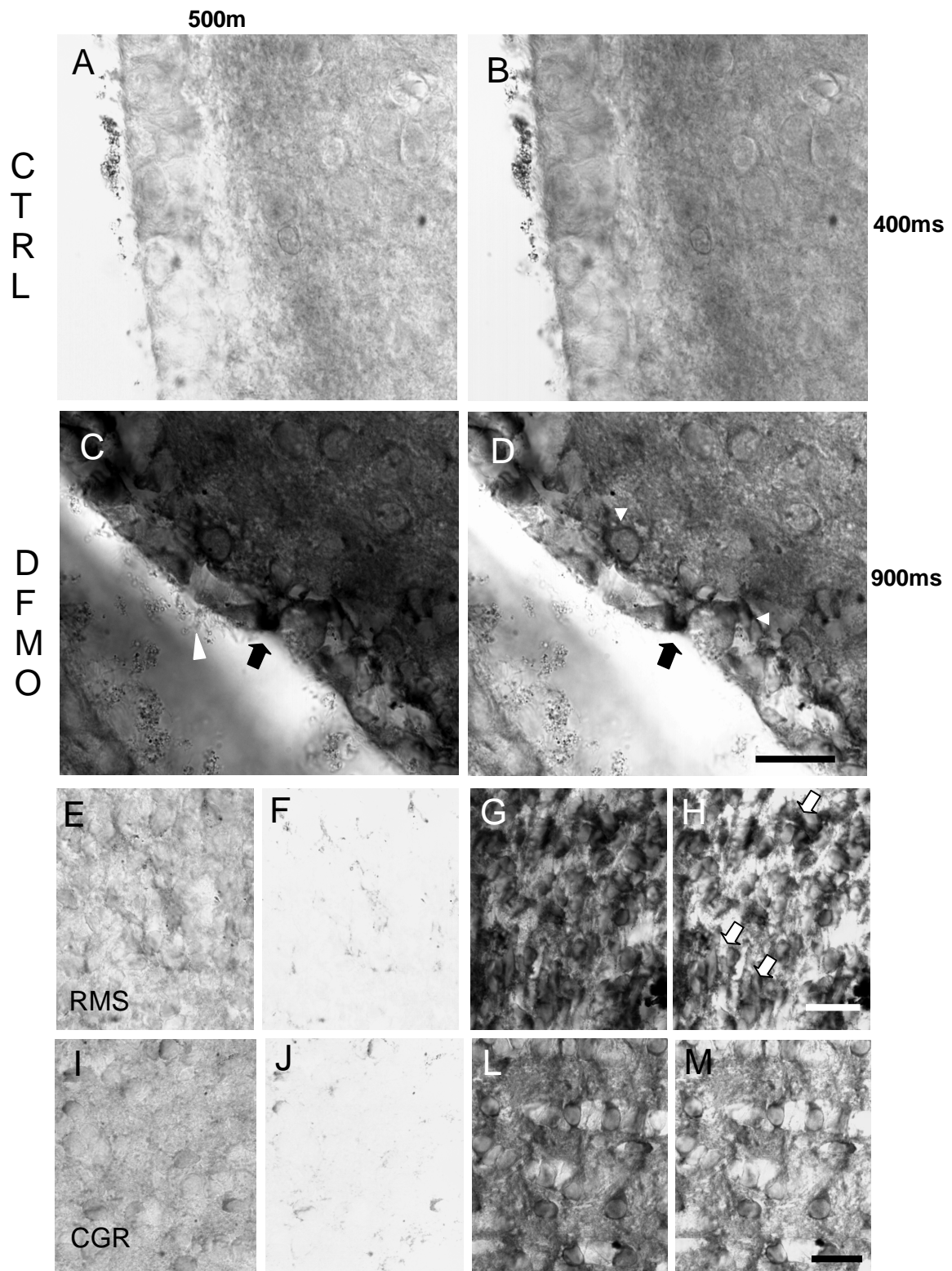


Figura 11. Imuno-histoquímica para GAD na SVZ de ratos após tratamento com DFMO. (A) SVZ ao redor dos ventrículos laterais de um animal controle com ausência de qualquer marcação. Essa foto possui o mesmo tempo de exposição que a foto em C (500ms). (B) O mesmo campo fotografado em A com tempo de exposição menor (400ms). (C) SVZ ao redor dos ventrículos laterais de um animal tratado com DFMO com alto nível de coloração de fundo. As cabeças de seta branca mostram os cílios das células endoteliais. A seta preta mostra uma célula marcada com GAD que não possui cílios. (D) Maior exposição do mesmo campo em C (900ms) mostrando células GAD positivas. A seta preta mostra a mesma célula indicada em C e as cabeças de seta brancas mostram exemplos de células GAD positivas. (E-H) Fotomicrografias da RMS de animais controle (E e F) e tratados com DFMO (G e H) mostrando o aparecimento da reação para GAD após o tratamento. As setas em H mostram grupos de células GAD positivas marcadas que podem representar cadeias de neuroblastos. F e G possuem a mesma exposição e E e H possuem uma exposição menor e maior respectivamente. (I-M) Fotomicrografias da camada de células granulares do bulbo olfatório de animais controle (I e J) e tratados (L e M) mostrando o aumento da intensidade de marcação dos neurônios granulares após tratamento. J e L foram expostas durante o mesmo tempo. I e M possuem exposições menor e maior respectivamente. Barras de calibração 20µm.

tratamento com DFMO aumenta a expressão de GAD na SVZ e camada de células granulares.

4.7- GABA regula migração de neuroblastos a partir de explantes cultivados

Há evidências de que GABA regula a velocidade de migração dos neuroblastos da SVZ em modelo de fatia organotípica (Bolteus e Bordey, 2004). Nesta tese também testamos este parâmetro. No entanto, o fizemos utilizando um método que nos permite analisar aspectos celulares do comportamento migratório de células a partir de explantes de SVZ (Miyakoshi et al., 2001). No modelo de cultura de explantes, os neuroblastos migram em cadeias utilizando uns aos outros como substrato para seu deslocamento (Wichterle et al., 1997; Miyakoshi et al., 2001), mecanismo semelhante àquele apresentado *in vivo* (Lois et al., 1996). Isto também permite analisar a influência de GABA sobre o modo migratório de neuroblastos. Esta abordagem terá implicações para os estudos de co-cultura que descreveremos mais adiante que utiliza explantes. Avaliamos o efeito de GABA sobre a migração dos neuroblastos em cultura de explantes de SVZ na ausência ou na presença de

GABA 100 μ M. Utilizando-se o Matrigel, uma matriz extracelular de lâmina basal, a migração de neuroblastos é favorecida, mas não a de astrócitos (Wichterle et al., 1997). Para ter certeza que o tratamento com GABA não estava mudando esta seletividade, realizamos imunocitoquímica para GFAP (marcador astrocitário) e β -tubulina de classe III (marcador neuronal). Observamos que as células que saíram dos explantes eram quase todas positivas para β -tubulina de classe III (Fig. 12A) e a saída de células GFAP positivas permaneceu limitada a algumas células por explante nos dois grupos experimentais (Figs. 12B e C). Para quantificar a migração para fora do explante adotamos diversos critérios. Ajustamos círculos que melhor contivessem a frente de migração (como exemplificado na Fig. 12 A) e analisamos a diferença entre o raio de migração e o raio do explante. Realizamos o mesmo procedimento comparando as áreas. O terceiro parâmetro comparado foi a maior distância percorrida por uma célula em cada explante. Em todos os critérios analisados o grupo que recebeu o tratamento de 100mM de GABA migrou uma distância significativamente maior que os controles (Figs. 12D, E e F).

4.8- Células da SVZ pós-natal invadem córtex cerebral embrionário de roedores

Durante a minha tese de mestrado, nosso grupo mostrou que células de explantes de SVZ pós-natal eram capazes de migrar sobre fatias de córtex cerebral embrionário em um modelo de co-cultura. Uma vez dentro da fatia, células da SVZ migram tangencial e ortogonalmente à orientação das fibras de glia radial dando origem a diversos tipos morfológicos no tecido hospedeiro (para resumo, Sequerra et al., 2003).

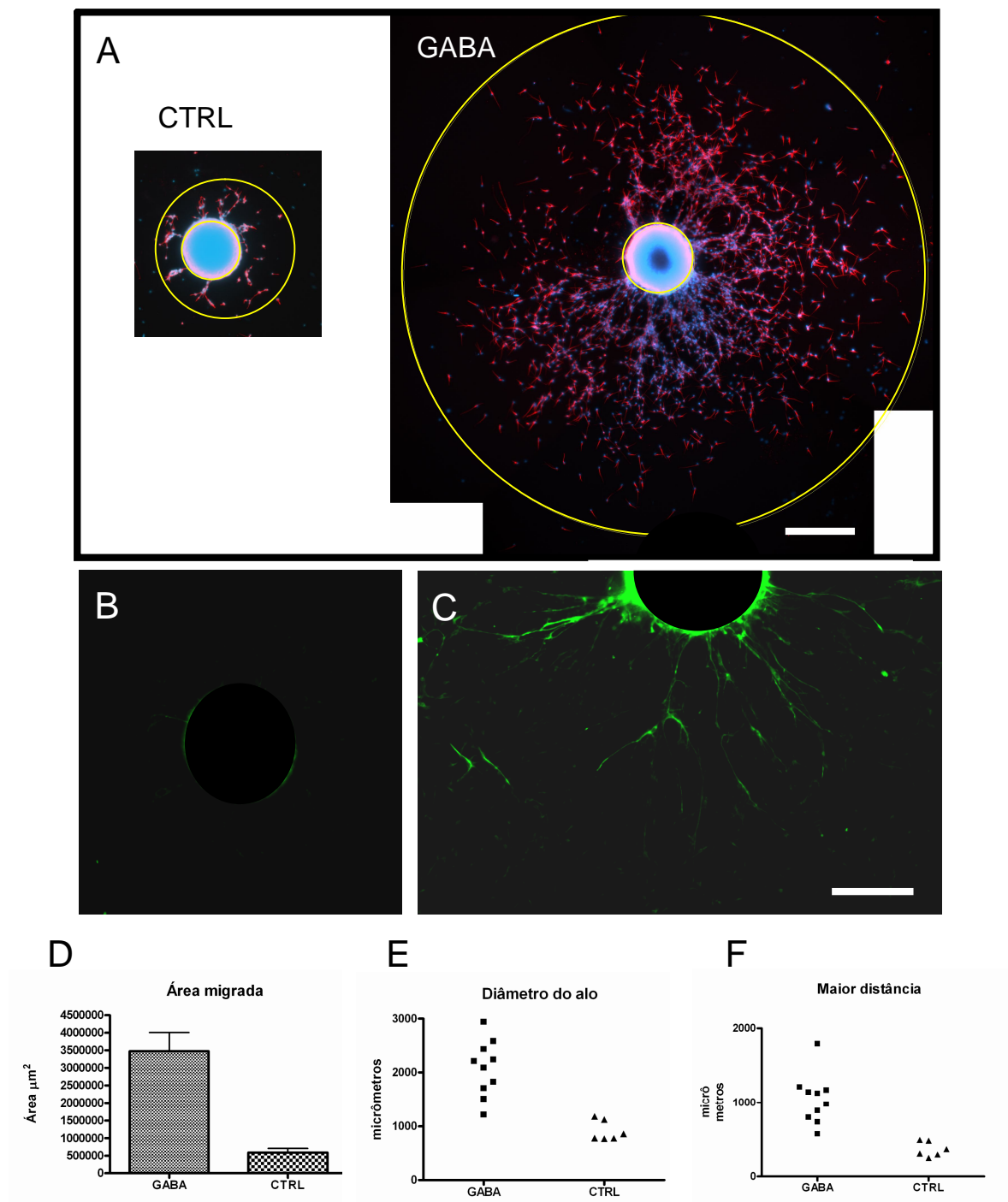


Figura 12- Migração de neuroblastos a partir de explantes de SVZ na presença de GABA. (A) Migração de neuroblastos Tuj1+ para fora de explantes de SVZ na presença (direita) e ausência (esquerda) de GABA 100mM. (B) Saída de células GFAP positivas de explantes controle e na presença de GABA (C). (D) Análise da diferença entre a área dos dois círculos, o que envolve a frente de migração menos o que envolve o explante em A. Média das diferenças no tratado e não tratado.. (E) Análise da diferença do diâmetro dos dois círculos. (F) Medida da distância da célula que mais migrou para o círculo que envolve o explante. Todas as análises resultaram em diferenças significativas entre os dois grupos experimentais ($P < 0,05$, teste t de *Student*). Barra de calibração em A=100µm e em C=50µm.

Como a SVZ é formada por diversos tipos celulares (Doetsch et al., 1997), tais como as células A, B e C, é preciso investigar quais são os tipos celulares capazes de invadir o córtex cerebral embrionário. Para observar se os astrócitos da SVZ são capazes de penetrar o córtex embrionário neste modelo, realizamos a co-cultura por 3 dias e após fixação imunoreagimos o tecido com o anticorpo contra GFAP. Num total de 3 fatias, contamos um total de 118 células. Em nenhuma delas as células GFAP positivas penetraram a placa cortical em desenvolvimento. Os explantes, como esperado, possuíam células GFAP positivas que migravam sobre a placa de cultura (Fig.13 A) e raramente (total de 4 células) sobre a fatia onde se limitavam aos primeiros micrômetros que provavelmente representam a VZ (Figs. 13B e C).

4.9- Neurotransmissores expressos por células da SVZ pós-natal transplantadas para o córtex embrionário

Como os neuroblastos da SVZ já expressam GABA durante a sua migração para os bulbos olfatórios (Bolteus e Bordey, 2004), uma hipótese que surge seria a de que estas células estão comprometidas com o fenótipo GABAérgico. Uma hipótese alternativa seria que sinais ambientais possam mudar este destino (veja discussão). Assim, como em nosso modelo as células da SVZ são capazes de invadir o tecido cortical embrionário, testamos se essas células podem diferenciar-se nos dois principais tipos de neurônios gerados nesta idade, o GABAérgico e o glutamatérgico.

Ao realizar a imunocitoquímica para GABA, observamos que boa parte das células GFP positivas na placa cortical expressava GABA (Fig. 14). Essas células possuíam inúmeros prolongamentos e distribuição independente das camadas corticais (Fig. 14A).

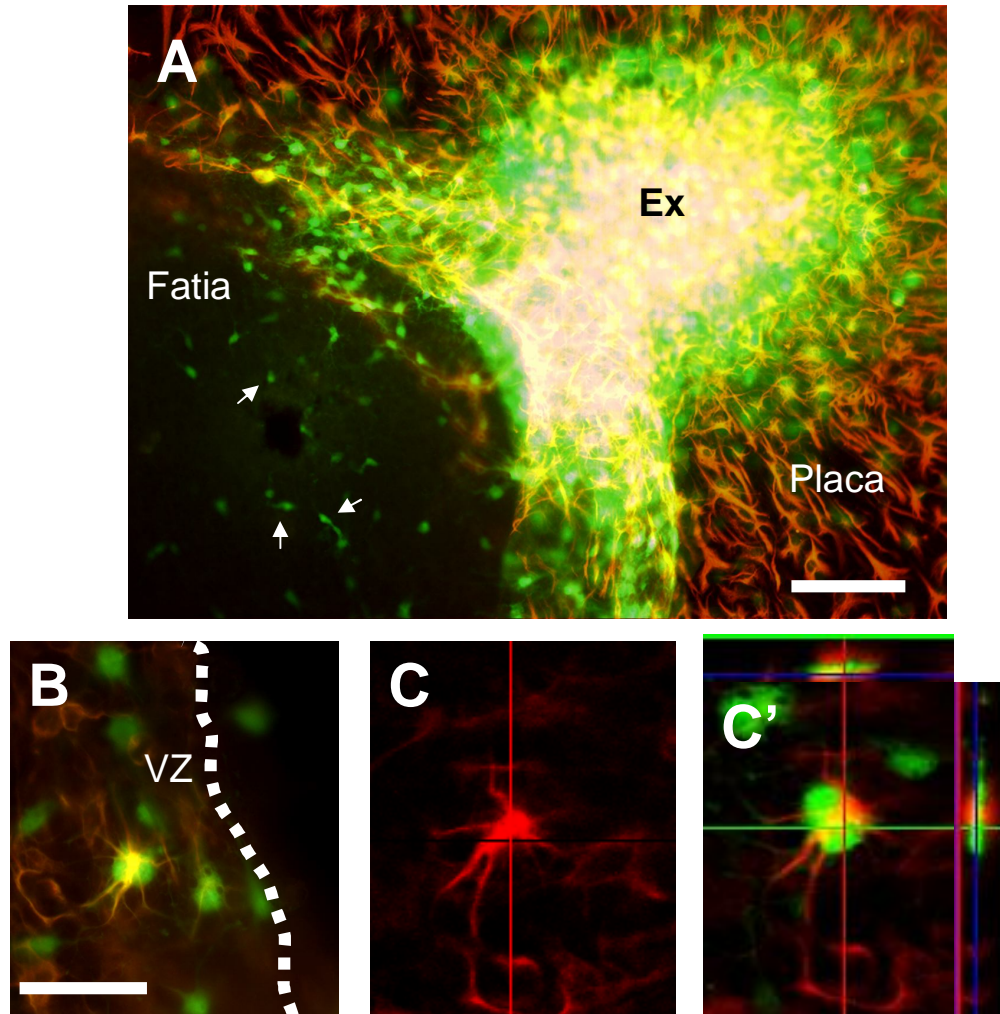


Figura 13. Células do explante de SVZ que entram na fatia não expressam GFAP. (A) Imagem de confocal mostrando a co-cultura de um explante de SVZ (Ex) expressando GFP e uma fatia de telencéfalo embrionário ambos imunoreagidos para GFAP. O explante toca a fatia pela superfície ventricular adjacente a placa cortical. Existem diversas células GFAP positivas no explante e saindo deste para a placa de cultura. As células GFP positivas migrando pela fatia não são GFAP positivas (setas). (B) Uma rara célula GFP/GFAP positiva dentro da fatia, próxima a superfície ventricular. (C) Corte óptico de 0,2 μ m mostrando a co-localização das marcações com GFAP e GFP. Barra de calibração em A= 100 μ m e em B= 20 μ m.

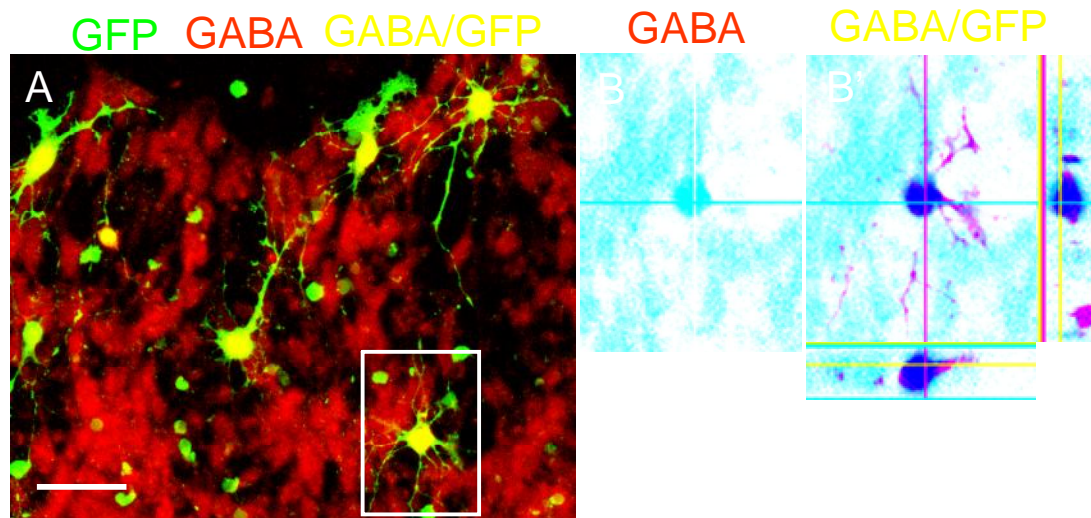


Figura 14. Expressão de GABA por células da SVZ co-cultivadas com fatias de telencéfalo embrionário. (A) Células GFP (verde) positivas expressando GABA (vermelho) na placa cortical. (B) Corte óptico de 0,1 μ m mostrando a co-localização da marcação de GABA. Barra de calibração= 20 μ m

Além das células com morfologia mais diferenciada, algumas células de corpo celular menor também expressavam GABA, podendo representar células mais imaturas (Fig.14A).

A imunohistoquímica para glutamato revelou que algumas células GFP positivas eram também positivas para glutamato (Fig. 15B). O glutamato algumas vezes não marca o corpo celular e sim os prolongamentos (para exemplo, Fig.15B). Porém em muitos casos a marcação abrange o citoplasma todo (para exemplo, Fig.15G). A diferenciação de células da SVZ em células glutamatérgicas favorece a idéia de que existem células nesta camada proliferativa que não estariam terminalmente comprometidas com o fenótipo GABAérgico.

Uma preocupação de nosso grupo é quanto à especificidade do anticorpo com o glutamato vesicular, marcando assim o neurotransmissor glutamato. O anticorpo utilizado foi produzido contra o L-glutamato fixado com glutaraldeído ligado a BSA. A idéia é que quando fixamos uma célula com glutaraldeído a única estrutura intracelular que forma um aglomerado protéico rico em L-glutamato é a vesícula glutamatérgica que está sendo direcionada para as sinapses. Evidência de que o anticorpo identifica apenas os neurônios glutamatérgicos está no fato da distribuição tecidual das células marcadas com glutamato se restringir à placa cortical (Fig 15A) onde é esperado encontrar os corpos celulares dos neurônios glutamatérgicos corticais. Nas regiões onde há migração tangencial de neurônios GABAérgicos há muitas células GFP positivas migrando (Fig.15A). Não há, no entanto, qualquer marcação glutamatérgica (ver Fig.15A). Após 3 DIV as células glutamato/GFP positivas encontradas possuem uma morfologia que se assemelha a um neurônio piramidal imaturo com dendrito apical proeminente e axônio descendente (Fig.15B). Após 5DIV encontramos células glutamato/GFP positivas com morfologia piramidal típica com dendrito apical proeminente apresentando espinhas dendríticas (Figs.15G e H), formato piramidal do corpo celular e a presença de dendritos basais e axônio (Fig. 15G; Miller,

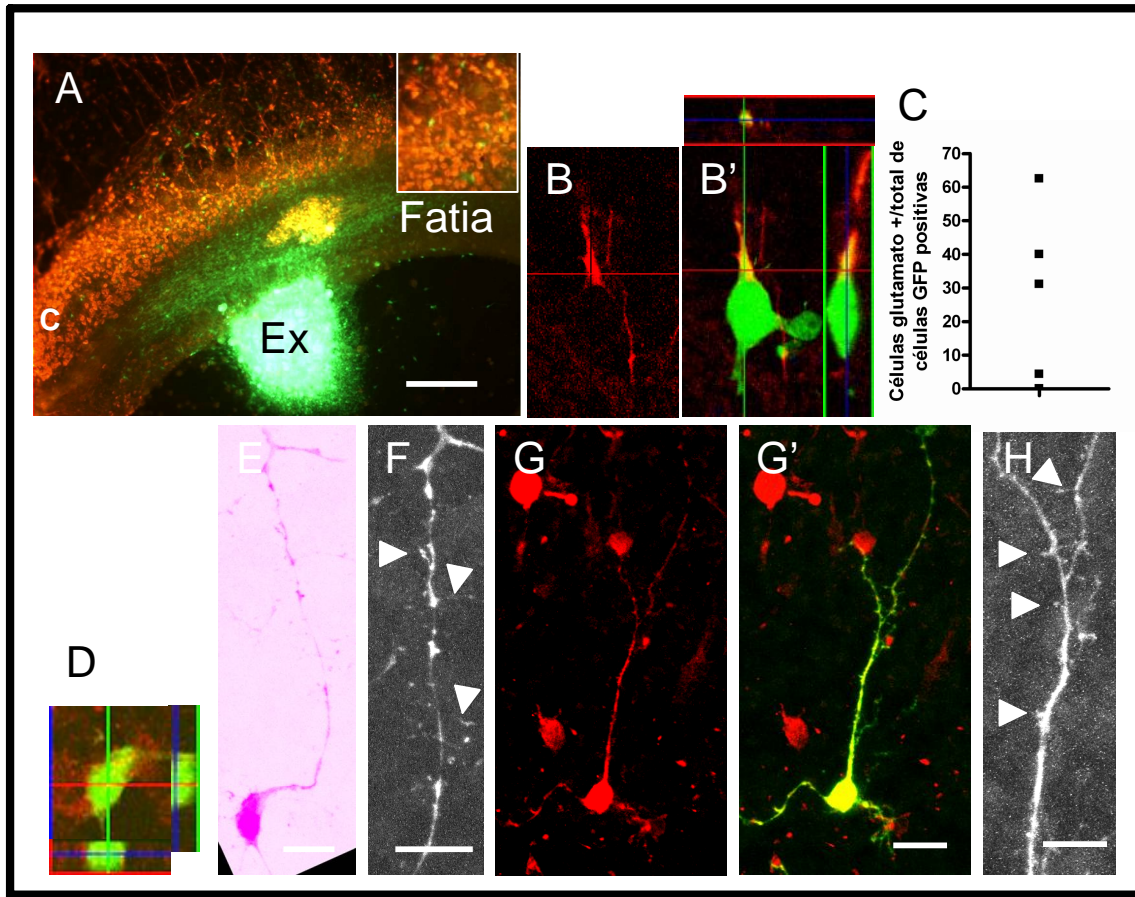


Figura 15- Expressão de glutamato pelas células da SVZ co-cultivadas com fatias de telencéfalo embrionário. (A) Co-cultura de explante de SVZ (Ex) expressando GFP com fatia de telencéfalo embrionário onde o Ex toca a superfície ventricular adjacente a placa cortical. Essa cultura foi imunoreagida com anti-L-glutamato que marca especificamente células da placa cortical (CP). (B) Corte óptico de uma célula encontrada na fatia em C mostrando a co-imunomarcagem de GFP (verde) e L-glutamato (vermelho-Cy3). (C) Quantificação da porcentagem de células glutamatéricas em relação às GFP positivas em cada 5 fatias imunoreagidas. (D) Corte óptico de uma célula L-glutamato negativa mostrada em E através do empilhamento de diversos cortes óticos. (F) Maior aumento de fragmento dendrítico da célula em E mostrando prolongamentos finos e compridos que aparentam ser primórdios de ramificações dendríticas (cabeças de seta). (G) “Stack” de uma célula glutamato positiva com morfologia piramidal, incluindo corpo triangular, dendritos basais e dendrito apical. G mostra a dupla-marcação de GFP e glutamato. (H) Maior aumento de dendrito da célula em G mostrando pequenas projeções grossas e curtas que se assemelham a proto-espinhas ou espinhas dendríticas (cabeças de seta brancas). Barras de calibração em A= 100µm, em E e G= 20µm, em E, F e H = 10µm.

1981; Peters e Kara, 1985). A comparação dos dendritos de células GFP positivas glutamato positivas com o de células GFP positivas e glutamato negativas mostrou que as últimas possuem um dendrito mais liso e com ramificações que alcançam comprimentos maiores (até 5 μ m), prováveis primórdios de ramificações dendríticas, enquanto aquelas células com morfologia piramidal possuem ramificações mais curtas (até 2 μ m), prováveis espinhas dendríticas, que são mais abundantes e deixam o dendrito com aspecto rugoso (Fig. 15F e H).

Realizamos como controle do potencial da SVZ na geração de tipos neuronais a co-cultura de fatias coronais de hamsteres em P5 e explantes de SVZ. Após 3DIV de co-cultura em dois experimentos independentes (total de 25 fatias) nenhuma célula dos explantes foi capaz de migrar na fatia de córtex cerebral. Assim, não foi possível analisar se os tipos celulares que encontramos nas co-culturas com fatias embrionárias são gerados na ausência dos sinais típicos dessa idade.

Quantificamos o percentual de células glutamatérgicas na subpopulação de células GFP positivas dentro da fatia para inferir sobre a quantidade de progenitores que apresentam plasticidade neuroquímica dentro da SVZ. Observamos que a porcentagem de células glutamato positivas varia muito entre os experimentos (Figura 15C). Esses dados sugerem, portanto a SVZ pós-natal é capaz de gerar neurônios glutamatérgicos quando submetidas a sinais embrionários.

5-Discussão

Neste trabalho mostramos que o GABA presente nos neuroblastos da SVZ pode ser sintetizado por uma via alternativa, a via da putrescina. Mostramos que a inibição da síntese de putrescina causa o aumento da expressão de GAD, sugerindo uma substituição da via de síntese, já que a expressão de GABA permanece inalterada. Mostramos ainda que progenitores presentes na SVZ podem demonstrar uma plasticidade no seu destino fenotípico, diferenciando-se em um tipo celular inesperado, o de neurônio glutamatérgico.

5.1-Neuroblastos da SVZ sintetizam GABA a partir de putrescina

Os resultados apresentados nesta tese mostram que as células da SVZ sintetizam GABA a partir de putrescina. De toda a putrescina captada pelas células da SVZ aproximadamente 30% é convertida em GABA. Além disso, estas células expressam a enzima que converte glutamato em GABA, GAD, em níveis basais que são detectáveis por atividade enzimática, mas não por imunohistoquímica.

As células da SVZ podem ter acesso a fontes de putrescina adjacentes, como o BO e o líquido ou sintetizar a própria putrescina. Não sabemos se a mesma célula que possui atividade de ODC na SVZ converte esta molécula em GABA. No entanto, comprovamos que as células que realizam a conversão são capazes de captar putrescina exógena como a H^3 -putrescina fornecida em nosso experimento. A detecção de atividade de ODC no plexo coróide de ratos está de acordo com a detecção de putrescina no líquido de humanos adultos (Morrison et al., 1995; Ekegren e Gomes-Trolin, 2005).

A expressão de GAD pelas células da SVZ é um tema contraditório na literatura. Pencea e Luskin (2003) relataram expressão de GAD na SVZ embrionária. A nossa interpretação para a diferença dos resultados deste grupo com os nossos é que elas estavam analisando uma população diferente de células. Durante o período embrionário, células GABAérgicas do bulbo olfatório são geradas na EGL (Wichterle *et al.*, 2001), e de fato células da SVZ da EGL neste período já expressam GAD (Stuhmer *et al.*, 2002). Porém estas células são pós-mitóticas (Anderson et al, 2001; Polleux et al., 2002; Xu et al., 2003; Zimmer et al., 2004), diferente dos neuroblastos da SVZ pós-natal (Menezes et al., 1995). Então uma interpretação para o fato de Pencea e Luskin (2003) encontrarem GAD na SVZ do embrião seria que elas estão olhando para uma população mista que além dos neuroblastos destinados ao BO também possui células que estão migrando para a placa cortical já expressando GAD. Assim é impossível comparar a expressão de GAD nestas duas idades porque as células não representam uma única população em dois momentos distintos.

De Marchis e colaboradores (2004) observaram que um camundongo que possui o gene marcador GFP expresso sob regulação do promotor da GAD65 apresenta aproximadamente 26% dos neuroblastos da SVZ marcados. Além disso, a análise do RNA mensageiro de GAD65 por RT-PCR detectou a presença desta molécula na SVZ. Porém a imunocitoquímica para GAD não revelou a proteína nestas células (De Marchis *et al.*, 2004) em acordo com os nossos resultados. De Marchis e colaboradores ainda observaram que o RNAm de GAD65 pode ser detectado em explantes dissecados de SVZ por RT-PCR. Estes resultados sugerem que o promotor de GAD65 está ativo em uma subpopulação de neuroblastos da SVZ, aproximadamente um quarto, mas que provavelmente a expressão da proteína está suprimida por mecanismos pós-transcricionais assim como acontece com a

enzima de síntese de dopamina, a tirosina hidroxilase (Saino-Saito *et al.*, 2004). Outra possibilidade é que o gene de GFP esteja sendo falsamente ativado por um efeito de posição (veja o próximo tópico da discussão). De qualquer maneira, como somente 26% dos neuroblastos da SVZ expressam GFP nestes animais, a presença de GAD não pode explicar a expressão de GABA por praticamente todos os neuroblastos da SVZ e RMS (Bolteus e Bordey, 2004). Utilizando um diferente anticorpo que reconhece as GAD65 e 67, Wang e colaboradores sugeriram que todas as células GABA positivas na SVZ expressam GAD (2003). Esses autores realizaram manipulações *in vitro* das fatias antes de realizar a imunohistoquímica. Esta manipulação pode estar induzindo como artefato experimental a expressão de GAD. Se nossa hipótese de que o GABA de putrescina está inibindo a expressão de GAD na SVZ (veja à seguir) está correta, uma possibilidade é que ao colocar as fatias em solução *in vitro*, Wang e colaboradores diluíram o GABA de putrescina liberando a expressão de GAD. Nosso padrão de marcação de GAD no BO está de acordo com aquela apresentada por outros autores (Ribak *et al.*, 1977; Mugnaini *et al.*, 1984; Kosaka *et al.*, 1985, 1987).

Uma terceira maneira em que o neurotransmissor GABA pode ser detectado no citoplasma de uma célula seria através do transporte desta molécula do meio extracelular. Porém apesar dos astrócitos da SVZ expressarem o transportador para GABA, GAT4, os neuroblastos migratórios não apresentam transportadores de GABA conhecidos (Bolteus e Bordey, 2004). Assim, a síntese de GABA por putrescina parece ser o principal mecanismo pelo qual os neuroblastos da SVZ expressam este neurotransmissor. A importância dessa via pode estar refletida no alto montante de putrescina que é revertido para a síntese de GABA, 30%. Essa porcentagem pode ainda estar subestimada considerando-se o GABA de putrescina que pode ter sido liberado pelas células antes do fim das 24 horas de cultura.

Nossos resultados com o inibidor da síntese de putrescina (DFMO) sugerem que a sinalização de GABA inibe a expressão da proteína GAD. No córtex cerebral de ratos, GABA inibe a expressão de GAD67 sem reduzir a expressão de seu RNAm (Rimvall et al., 1993) sugerindo que o mecanismo molecular é pós-transcricional. Um possível mecanismo para a inibição da expressão seria o aumento da degradação da proteína. Almeida e colaboradores (2002) mostraram que a redução dos níveis de GAD por GABA é a mesma na presença de anisomicina, um inibidor de síntese protéica, logo a inibição por GABA não deve resultar de degradação enzimática. Assim, o mecanismo de inibição de GAD por GABA parece estar localizado no processo de tradução. Almeida e colaboradores (2002) mostraram que o efeito da sinalização de GABA sobre a expressão de GAD é independente dos receptores de GABA, o que sugere que esta sinalização possa ser mediada por transportadores de membrana. Os neuroblastos da SVZ, no entanto não expressam transportadores GABAérgicos de membrana (Bolteus e Bordey, 2004). Essa diferença sugere que existam vários mecanismos de inibição da expressão de GABA por GAD e que o mecanismo que ocorre na SVZ deve ser investigado separadamente. É importante lembrar que a evidência de que o GABA de putrescina regula a expressão de GAD é indireta. Há a possibilidade da própria putrescina regular os níveis de GAD diretamente. Pretendemos analisar o efeito do tratamento com GABA sobre a expressão de GAD pelos neuroblastos em nosso modelo de cultura de explantes de SVZ.

Não podemos afirmar que esta síntese de GABA esteja sendo realizada somente pelos neuroblastos da SVZ. A síntese de GABA por putrescina já foi relatada para precursores gliais (progenitores O2-A) do nervo óptico *in vitro* (Barres et al., 1990), portanto, os astrócitos da SVZ também podem estar envolvidos na conversão putrescina/GABA nestas células. Liu e colaboradores (2005) utilizando um animal que possui a expressão de GFP

regulada pelo promotor do GFAP humano, mostraram que nenhuma das células GFP da SVZ expressam GABA. Esse resultado é contraditório com resultados do mesmo grupo que mostram a expressão de um transportador de GABA nos astrócitos da SVZ (Bolteus e Bordey, 2004). Nós realizamos a imunohistoquímica para GABA e GFAP (dados não mostrados) e não observamos nenhuma célula com dupla marcação. Ressalva-se, no entanto, que o anticorpo monoclonal contra GFAP (Sigma; Debus et al., 1983) que utilizamos neste experimento marca poucos astrócitos na SVZ em comparação ao encontrado utilizando outros anticorpos (Alves et al., 2002). Tendo em vista estes dados e os da literatura mencionados acima, o tipo celular mais provável a realizar a conversão de putrescina em GABA na SVZ é o neuroblasto.

Assim, estamos propondo que os neuroblastos utilizam a putrescina para sintetizar GABA. Essa molécula é utilizada na SVZ para regular fenômenos de desenvolvimento como a proliferação (Nguyen et al., 2003; Liu et al., 2005) e a migração (Bolteus e Bordey, 2004). Essa via é utilizada porque os neuroblastos da SVZ, ou sua maioria, não estão comprometidos com o fenótipo GABAérgico e então não expressam GAD. A expressão de GABA de putrescina regula a expressão de GAD e mantém as células no estado indiferenciado.

5.2- O código epigenético e reformulações conceituais sobre a diferenciação celular

A realização da síntese neodarwinista uniu as idéias de Darwin de seleção natural às idéias de Mendel de herança genética (Mayr, 1980). Essa união foi muito importante do ponto de vista histórico, para a formalização da evolução como área do conhecimento, mas teve uma influência importante sobre a forma como se pensava em biologia. Como os

alelos carregavam toda a informação sobre o fenótipo selecionado, o desenvolvimento embrionário passou a ser visto como a revelação de um filme fotográfico codificado nos genes. Assim, a biologia do desenvolvimento não possui importância alguma para o entendimento da evolução (para discussão e contextualização histórica, Amundson, 2005). Essa visão “genecentrada” foi depois reforçada com a elaboração do dogma central da biologia onde o DNA dá origem ao RNA que dá origem à proteína e ao fenótipo consequente, o programa genético, e a descrição de sistemas simples de regulação gênica como o *operon lacZ* (Jacob e Monod, 1961; Mayr, 1961). A cristalização dessas idéias na comunidade científica é exemplificada em Dawkins (1986) refletindo sobre sementes de salgueiro caindo do lado de fora da sua janela:

“It is raining DNA outside... The cotton wool is made mostly of cellulose, and it dwarfs the capsule that contains DNA, the genetic information. The DNA content must be a small proportion of the total so why did I say it was raining DNA rather than raining cellulose? The answer is that it is the DNA that matters... The whole performance-cotton wool, catkins, tree and all-is in aid of one thing only, the spreading of DNA around the country side... It is raining instructions out there: it's raining programs: it's raining tree-growing fluff-spreading algorithms. This is not metaphor, it is plain truth. It couldn't be plainer if it were raining floppy discs.”

Em 1939, Conrad H. Waddington cunhou o termo epigenótipo. Esse termo referia-se a interação dos genes e seus produtos com o ambiente que por fim levam ao fenótipo. Waddington acreditava que o genoma não só possui atividade graças a um programa genético como era também reativo, respondendo a estímulos externos. Suas idéias caíram em descrédito por terem sido mal interpretadas como defensoras da transmissão para as próximas gerações de caracteres adquiridos (veja Gilbert, 1991).

Mas quais são os mecanismos moleculares que permitem a uma célula saber em que contexto ela está e qual foi sua história de vida? Existem diversos mecanismos candidatos, mas para simplificar a discussão desse tema me deterei em um específico que tem recebido muita atenção ultimamente, o remodelamento da cromatina (para revisão, Li, 2002). A estrutura tridimensional do DNA envolve o enovelamento deste ao redor de octâmeros de histonas (Kornberg e Thomas, 1974; Luger et al., 1997). As estruturas formadas, os nucleossomos, ainda se enovelam em estruturas de ordem maior que no fim levam às formas transcricionalmente ativas ou inativas de cromatina, eucromatina ou heterocromatina respectivamente. Uma das características das histonas é que elas possuem caudas N-terminais que se projetam para fora do nucleossomo (Luger et al., 1997). Essas caudas N-terminais podem sofrer modificações pós-traducionais que ditam o tipo de interação daquele nucleossomo com nucleossomos vizinhos (Li et al., 2007). Assim, nucleossomos que estejam interagindo mais fortemente, como os que possuem histonas desacetiladas, formam estruturas mais compactas e deixam o DNA menos acessível a outras proteínas como as reguladoras da transcrição (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Zhang e Reinberg, 2001).

Mas até ai não estamos fugindo da idéia de programa genético. Como as modificações da cromatina levam a aquisição de informação? A grande diferença da regulação gênica através de modificações na cromatina para mecanismos com ativadores e silenciadores (como o proposto por Jacob e Monod, 1961) é que o primeiro mantém memória de uma situação ambiental passada. O sistema não precisa ficar sendo alimentado com uma informação ambiental como, por exemplo, a presença ou a ausência de lactose. As modificações na cromatina podem funcionar como pontos finais de regulação e silenciar

permanentemente uma região específica do DNA ou mesmo serem dinamicamente alteradas por sinais ambientais (Hazzalin e Mahadevan, 2005).

Na diferenciação neuronal uma proteína chamada REST desempenha um papel importante na formação dessa memória molecular. REST reconhece uma sequência presente em diversos genes neuronais (Schoenherr et al., 1996). Em células não neuronais, REST recruta diversas proteínas que modificam a cromatina para uma forma silenciosa. Quando a diferenciação neuronal é induzida por um sinal ambiental, como ácido retinóico, a expressão de REST é inibida pelo fechamento da cromatina na região promotora de seu gene e os genes neuronais são expressos (Ballas et al., 2005). Assim esta célula ganhou uma informação que foi incorporada e não depende para sua manutenção da alimentação com ácido retinóico. O estado de compactação das diferentes regiões do genoma define o repertório de genes que podem ou não ser ativados e assim, também a história pregressa da célula. A informação armazenada através da disponibilidade do DNA à transcrição promovida pelo enovelamento diferencial do DNA vem sendo chamada de código epigenético (Turner, 2007).

Mas por que esse mecanismo de regulação é importante para o assunto desta tese? Esta tese versa sobre o potencial de progenitores específicos na geração de diferentes tipos celulares e possíveis mecanismos de plasticidade que podem alterar o destino final de células frente a sinais ambientais. Têm se discutido fartamente a possibilidade de substituição de células perdidas por lesões ou por doença no tecido neural jovem e adulto. Progenitores intrínsecos ou derivados de células-tronco neurais são candidatos à reposição de tecido neural perdido (para revisão, Gage 2000;). Várias suposições que embasam as linhas de conduta experimental não levam em conta o conhecimento proveniente desta área. Enumeraria em primeiro lugar o uso de neuroesferas para identificar células-tronco neurais

(Reynolds e Weiss, 1992). Essa metodologia utiliza a cultura não aderente de possíveis candidatas a células-tronco neurais na presença de EGF e bFGF formando agregados clonais. Após isso, essas células podem ser plaqueadas diferenciando-se nos três tipos celulares neurais, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Porém, este tratamento causa a perda de informação posicional (Gabay et al., 2003; Hack et al., 2004) e leva a um aumento da potencialidade de progenitores da medula espinal embrionária que passam a ser tripotentes (Gabay et al., 2003). Na verdade, experimentos de acompanhamento de progênie *in vivo* nunca mostraram a existência de progenitores tripotentes (i.e., Fekete et al., 1994; Reid et al., 1995). Uma possível explicação para este fenômeno é que o método de produção de neuroesferas causa uma mudança no código epigenético que resulta na mudança dos possíveis repertórios de genes ativados. De fato, quando progenitores restritos à linhagem oligodendrocítica são tratados com BMP2 *in vitro* passam a poder dar origem às três linhagens neurais (Kondo e Raff, 2004). Essa mudança no potencial celular requer a ativação da expressão do fator de transcrição *sox2* através do remodelamento da cromatina na região do “*enhancer*” desse gene (Kondo e Raff, 2004). A mudança no repertório de genes a serem expressos deve envolver a perda de informações da história de vida das células. Esse apagar de informações adquiridas pode levar a aberrações como células que expressam marcadores neuronais e astrocitários ao mesmo tempo (Laywell et al., 2005) e após algumas gerações passam a apresentar células com números anormais de cromossomos (Palmer et al., 1997). Por essas razões, a interpretação de resultados de plasticidade fenotípica obtidos com células que passaram por esse tipo de manipulação *in vitro* é complicada se não separarmos o que é realmente fisiológico dessa população e o que está sendo induzido pela técnica. Por essas razões não me refiro aos trabalhos com células da SVZ que passaram por grandes períodos de cultura *in vitro*.

Outra crítica refere-se ao uso de transgênicos que possuem a expressão de genes repórter sob regulação de regiões reguladoras específicas de interesse. As técnicas utilizadas para a inserção de genes levam a uma incorporação dessa sequência em uma região aleatória do genoma. Logo, a expressão desse gene vai depender não só da presença de um fator de transcrição que reconheça sua sequência de interesse como também se a região onde o gene está é uma região de heterocromatina ou de eucromatina. Esse efeito de posição foi primeiro descrito por Muller (1930, *apud* Felsenfeld, 2007) enquanto observava o efeito de translocações cromossômicas sobre o fenótipo do olho de *Drosophila*. Antes do início da gliogênese telencefálica, por exemplo, o fator de transcrição que reconhece a região promotora de GFAP (um marcador de linhagem astrocitária), o STAT3, já está presente. Porém, a sua ligação a esta região é impedida pela metilação de citosinas (Takizawa et al., 2001) alteração geralmente relacionada com a formação de heterocromatina (Wolffe e Matzke, 1999). A desmetilação dessa região é ativada pela sinalização de FGF2 no início da gliogênese (Song e Ghosh, 2004). Mas será que todos os astrócitos possuem essa região desmetilada e passam a expressar GFAP? Um trabalho recente que analisou camundongos “*knock in*” com a expressão de GFP sob regulação da região promotora de GFAP humana mostrou que existem mais células expressando GFP do que aquelas positivas para GFAP (Emsley e Macklis, 2006). Assim, uma possível explicação para essa observação seria que o transgene está dentro de uma região de eucromatina nas células GFP positivas/GFAP negativas enquanto o seu gene GFAP está dentro de heterocromatina, produzindo um falso positivo. Falsos negativos são também possíveis caso o transgene caia em uma região de heterocromatina. Esses modelos ainda passam pelas críticas comuns a técnicas de detecção de RNA mensageiro, uma vez que a presença dessa molécula não garante a expressão da proteína.

Uma outra crítica contra a atual visão sobre o conceito de diferenciação refere-se ao uso de fatores de transcrição como marcadores fenotípicos. Nos anos 80, a descrição da participação de genes homeóticos durante o desenvolvimento levou a elaboração do conceito de genes mestre (veja Gehring e Hiromi, 1986). De fato, as células utilizam em seus sistemas de expressão gênica, genes que regulam grupos maiores de outros genes. Um fenômeno recorrente na literatura é a classificação de um fator de transcrição como o determinante de um fenótipo específico. Para abordar um tema importante para esta tese, vamos tomar como exemplo os genes *Dlx* na determinação do fenótipo GABAérgico do telencéfalo embrionário. Os neurônios GABAérgicos tem sua origem em estruturas chamadas eminências ganglionares (EGs) e expressam *Dlx1* e *2* (Anderson *et al.*, 1997). Como a SVZ expressa o fator de transcrição *Dlx2* (Doetsch *et al.*, 2002) e dá origem a neurônios GABAérgicos do BO, surgiu a hipótese de que os progenitores da SVZ com potencial neuronogênico teriam sua origem de células-tronco presentes na camada germinativa ventral (Anderson *et al.*, 2001; Stenman *et al.*, 2003). Para confirmar se a SVZ tem origem exclusivamente dos precursores das EGs, uma pergunta óbvia seria se os marcadores dorsais típicos são expressos nessa camada proliferativa e assim essa teria uma dupla origem. De fato, os mutantes de perda de função do fator de transcrição *Pax6* (*sey/sey* da mutação de camundongos *small eye*), que é expresso pelas células de glia radial do pálido dorsolateral (Malatesta *et al.*, 2003), não apresentam formação dos placôdos, do epitélio e dos bulbos olfatórios (His *et al.*, 1991). Para testar a importância deste fator de transcrição na diferenciação dos interneurônios do bulbo olfatório, Kohwi e colaboradores (2005) transplantaram células GFP positivas da eminência ganglionar lateral (EGL) de animais *sey/sey* para a SVZ de animais adultos normais, portanto com bulbo olfatório e via migratória rostral intactos. O que eles observaram foi que essas células eram incapazes de

se diferenciar em interneurônios dopaminérgicos das camadas granular e periglomerular (Kohwi *et al.*, 2005). Porém Pax6 possui uma região de sobreposição de expressão com marcadores ventrais sobre a borda pálio-subpálio no embrião (Terreson *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001), que se encontra exatamente na LGE dorsal. Essa sobreposição levou Kohwi e colaboradores (2005) a formular a hipótese que os progenitores da SVZ pós-natal que dão origem aos neurônios dopaminérgicos do bulbo olfatório teriam sua origem na região da LGE que possui a expressão de Pax6. Isso é, ao invés de concluir que a SVZ tem sua origem em ambas as populações - Dlx e Pax6 positivas, Kowi e colaboradores (2005) concluíram que a SVZ tem sua origem em uma diminuta população celular que co-expressa os dois marcadores. Uma interpretação mais abrangente seria a de que todas as células remanescentes da VZ que um dia expressaram Pax6 (inclusive as da VZ dorsal), possam dar origem a estas células. Essa última idéia, já foi confirmada com a observação de que a progênie da glia radial dorsal pode dar origem a neurônios que compõe a SVZ e dá origem a neurônios do BO (Ventura e Goldman, 2007; Merkle *et al.*, 2007). Mas de qualquer forma, a observação de que os neuroblastos da SVZ já expressam Dlx2 pode induzir a idéia de que estes já estão comprometidos com o fenótipo GABAérgico. Nosso grupo mostrou que as células da SVZ não expressam níveis detectáveis por imunohistoquímica de GAD (Sequerra *et al.*, 2007). E estamos sugerindo que estas células podem não estar definitivamente comprometidas com o fenótipo GABAérgico enquanto na SVZ.

Mas então como conciliar a expressão de Dlx2 e a ausência de comprometimento GABAérgico? Acontece que quando um fator de transcrição é expresso ele encontra um genoma que está organizado de forma a refletir informações provenientes da história daquela célula. Assim, em duas células diferentes ele pode ativar caminhos de diferenciação distintos. Essa influência do ambiente passado sobre os caminhos de

diferenciação foi chamada por Waddington de paisagem epigenética (1957; veja também Gilbert, 1991; Fig.16). Quando o padrão de expressão de três diferentes genes homeóticos foi observado em diferentes espécies de equinodermas observou-se que estes orquestraram o aparecimento de diferentes funções ao longo da evolução deste grupo (Lowe e Wray, 1997). Mas isso não quer dizer que um caminho de desenvolvimento que é regulado por aquele gene em uma espécie não acontece em outra só porque o gene está ausente. Pode ser que os caminhos ontogenéticos apareçam primeiro e depois os genes homeóticos integrem aquele sistema como tampões que garantem a existência desse caminho. Outro conceito importante introduzido por Waddington é o de assimilação genética (1942). Se durante o desenvolvimento das pupas de *Drosophila* for dado um choque térmico de 40°C, essas desenvolvem defeitos nas veias cruzadas de suas asas. Esse efeito induzido pelo ambiente passa a aparecer sem nenhum gatilho ambiental após 14 gerações de cruzamentos entre os indivíduos afetados (Waddington, 1953). Como esse efeito acontece em muitos indivíduos ao mesmo tempo, ele não se deve a mutações na sequência de DNA. Assim, os organismos possuem múltiplas possibilidades de desenvolvimento que estão escondidas como caminhos não seguidos da paisagem. E a interação dos genes homeóticos com a sequência do DNA não pode explicar totalmente essas tomadas de decisão. Estas informações nos indicam que pode ser enganoso assumir que os genes homeóticos estão no topo de uma cadeia regulatória unidirecional. A sua função depende do contexto onde a sua célula se insere. Assim como pode ser um erro concluir que a expressão de *Dlx2* nas células da SVZ leva a um fenótipo GABAérgico sem observar se estas expressam marcadores diretamente ligados a esse fenótipo, como GAD.



Figura 16. Essa pintura de John Piper foi utilizada por Waddington para ilustrar a capa de seu livro “Organisers and Genes” (1940) e ilustra uma paisagem epigenética onde um rio representa uma célula que pode seguir diversos caminhos durante o desenvolvimento de acordo com as condições encontradas no seu percurso. Adaptado de Slack (2002).

5.3- Plasticidade de progenitores da SVZ quanto ao seu destino neuroquímico

O neuroepitélio embrionário produz diversos tipos neuroquímicos de maneira espaço dependente (Marín e Rubenstein, 2001). Os neurônios glutamatérgicos gerados neste período vêm das posições mais dorsais enquanto neurônios GABAérgicos são gerados em porções mais ventrais. No fim da neurogênese embrionária, as células que estavam dando origem á esses neurônios, as células de glia radial (Noctor et al., 2000), se diferenciam em astrócitos da SVZ (Alves et al., 2002; Tramontin et al., 2003) e células ependimárias (Spassky et al., 2005). Esses dois tipos celulares assumem o papel de gerar neurônios até o fim da vida do animal (Doetsch et al., 1999; Johanson et al., 1999; Moma et al., 2000; Coskun et al., 2008). Pós-natalmente, no entanto, progenitores derivados de células de glia radial ao longo de todos os eixos da SVZ passam a gerar neurônios GABAérgicos do BO em roedores (Merkle et al., 2007). Experimentos de transplante heterotópico sugerem que esses precursores estão comprometidos com um tipo neuronal específico de forma independente do ambiente (Merkle et al., 2007).

Em paralelo, a esta aparente reprogramação dos progenitores dorsais para a geração de interneurônios majoritariamente GABAérgicos, o oposto parece acontecer em relação a potencialidade de gerar neurônios glutamatérgicos. Poucas são as demonstrações empíricas de geração pós-natal de novos neurônios glutamatérgicos (veja a seguir). Nossos resultados mostram que existem progenitores dentro da SVZ pós-natal capazes de gerar neurônios glutamatérgicos. Duas hipóteses podem explicar essa existência em conciliação com os dados da literatura. A primeira seria que existem progenitores capazes de gerar esse tipo celular, mas não o fazem por falta de um gatilho ambiental (progenitores silentes). A

segunda hipótese seria a de que os mesmos progenitores que geram neurônios para o BO no período pós-natal, quando na presença de sinais ambientais presentes unicamente no embrião geram neurônios glutamatérgicos (progenitores plásticos). Ambas as hipóteses podem incluir ainda o fato de que alguns progenitores não dão origem a neurônios glutamatérgicos (e provavelmente dão origem a neurônios GABAérgicos).

Em nossos experimentos, nós separamos dois grupos de explantes de SVZ, o primeiro grupo formado pela SVZ que margeia o ventrículo lateral e está adjacente ao corpo estriado, e o segundo grupo formado pela extensão rostral da SVZ até o BO. Ambas as regiões foram capazes de dar origem a neurônios glutamatérgicos e a porcentagem desses neurônios gerados não teve nenhuma correlação clara com a região, por isso, não separamos os grupos na apresentação de nossos resultados. Como os neuroblastos gerados na SVZ se deslocam amplamente por esta camada germinativa (Suzuki e Goldman, 2003), a separação destes dois grupos de explantes não é um método adequado para a avaliação de progenitores gerados em diferentes localidades. Assim, é possível que apenas uma pequena localidade da SVZ esteja gerando esses progenitores mais plásticos que se espalham por migração. Estamos começando a trabalhar com a tecnologia de adenovírus incompetentes para replicação codificando o gene repórter Gfp. Essa técnica nos possibilitará marcar seletivamente a glia radial de regiões específicas e testar se a capacidade de geração de neurônios glutamatérgicos é localizada em alguma região específica da SVZ.

Experimentos de transplante heterotópico de micro-regiões da SVZ sugerem que há um comprometimento destas células com classes específicas de neurônios do BO (Merkle et al., 2007). Uma interpretação alternativa para estes dados seria a de que os sinais necessários para a diferenciação de cada tipo celular sejam os mesmos, mas sejam interpretados de forma diferente por cada população. Assim uma população que é gerada

mais rostralmente quando transplantada para uma posição mais caudal na verdade veria os mesmos sinais de sempre ao longo de sua via migratória. Segundo nossa hipótese, os neuroblastos da SVZ apenas se comprometem com o fenótipo GABAérgico, como indicado pela expressão de GAD, quando penetram a camada granular do BO, região pela qual os diferentes tipos celulares passariam. Assim pode ser que cada população migre até o BO sem uma determinação fenotípica programada e sim perceba os sinais locais de forma diferente de acordo com sua paisagem epigenética. Assim o paradigma experimental apresentado aqui nesta tese, onde os sinais ambientais apresentados para as células da SVZ são realmente diferentes daqueles presentes no animal doador, é mais adequado para avaliar a plasticidade dessa população. Esses sinais presentes nas fatias embrionárias seriam suficientes para induzir o fenótipo glutamatérgico.

Alguns trabalhos mostram que o comprometimento neuroquímico depende também de sinais ambientais. O tratamento com citocinas e fatores neurotróficos leva neurônios ganglionares simpáticos a expressar acetilcolina ao invés de noradrenalina *in vitro* ou *in vivo* (Furshpan et al., 1976; Landis e Keefe, 1983; Nawa e Patterson, 1990). Neurônios simpáticos em cultura possuem um menor potencial para diferenciar em neurônios colinérgicos quando são despolarizados (Wallicke et al., 1977), efeito que é revertido pela inibição do influxo de Ca^{2+} (Wallicke e Patterson, 1981). Neurônios espinhais embrionários quando estimulados com frequências específicas de transientes de Ca^{2+} espontâneos aumentam a expressão do RNAm de GAD67 (Watt et al., 2000). Borodinsky e colaboradores (2004) mostraram que a alteração no padrão de picos de Ca^{2+} na medula de *Xenopus* embrionária logo após o fechamento do tubo neural pode alterar o destino neuroquímico dos neurônios. A inibição da atividade leva a um aumento na incidência da expressão de neurotransmissores excitatórios, enquanto o aumento leva a mais células

inibitórias. Neurônios sensoriais do gânglio petroso respondem à despolarização desenvolvendo o fenótipo dopaminérgico (Hertzberg et al., 1995). Porém dentro desta população, somente os neurônios que expressam os fatores de transcrição Phox2a e b são responsivos a este tratamento (Brosenitsch e Katz, 2002). Assim os fatores de transcrição compõem a paisagem epigenética destas células criando caminhos que são seguidos após o disparo do gatilho ambiental adequado.

Existe sempre um período crítico onde os sinais ambientais podem atuar resultando na plasticidade do sistema. No caso do efeito da atividade sobre as células da medula de *Xenopus*, por exemplo, a intervenção deve ser feita até cinco horas após o início da atividade elétrica dessas células (Borodinsky et al., 2004). Não está claro qual é o período crítico no qual os neuroblastos da SVZ estão sujeitos à plasticidade de seu fenótipo neuroquímico. Além do período crítico ao longo da diferenciação celular, também temos que discernir se todos os neuroblastos podem originar células glutamatérgicas ou se isto é restrito a subpopulações específica. Algumas subpopulações de neuroblastos, por exemplo, deixam o ciclo celular ainda próximo ao ventrículo enquanto outras continuam a ciclar até o BO (Smith e Luskin, 1998). Como não encontramos expressão de GAD até a camada granular do BO, pode ser que mesmo as populações que deixam o ciclo mais cedo continuem dentro do período crítico para a regulação ambiental de seu fenótipo neuroquímico. Encontramos células glutamatérgicas geradas a partir de explantes da SVZ adjacente ao bulbo (dado não mostrado). Determinar se células da SVZ ainda ciclam após serem plaqueadas será interessante para observar se o período crítico da determinação neuroquímica possui relação com a saída do ciclo celular.

A expressão de GAD pode ser regulada por atividade mesmo em neurônios diferenciados (Benson et al., 1994). Durante o desenvolvimento humano, as histonas H3

passam a um estado trimetilado no promotor de *gad67*, chegando ao pico de expressão desse gene na fase pós-puberdade (Huang et al., 2007). Pacientes esquizofrênicos apresentam uma redução na trimetilação desta histona. Porém, a administração de clozapina, um anti-psicótico, aumenta a expressão desta histona trimetilada em um camundongo no qual esta modificação é reduzida (heterozigoto para uma mutação no gene da metil transferase leucêmica de linhagem mista 1). A expressão de genes necessários para o fenótipo GABAérgico é regulada desta forma não só no processo de diferenciação mas também após a maturação do neurônio. Nossos resultados sugerem que a expressão de GAD é também regulada por GABA a partir de putrescina nos neurônios granulares do BO.

Dois artigos do mesmo grupo mostraram que a ablação específica de populações de neurônios de projeção cortical (que se assume que são neurônios piramidais glutamatérgicos) ativa a neurogênese que leva a substituição parcial da população perdida. Esses trabalhos utilizaram o marcador DCX (do inglês, *doublecortin*, marcador de migração neuronal) para mostrar que neuroblastos migratórios se posicionam na substância branca após esta ablação, o que sugeriria que os novos neurônios estão sendo gerados na SVZ, pois a substância branca separa esta camada da placa cortical (Magavi et al., 2000; Chen et al., 2004). Se confirmada esta observação seria uma confirmação *in vivo* de nossas observações de que a SVZ pode dar origem a neurônios glutamatérgicos. Nessas áreas que sofreram ablação a expressão de neurotrofinas como BDNF e NT-4/5 é aumentada (Wang et al., 1998) podendo estas ser moléculas sinalizadoras encontradas em nossas fatias embrionárias. Porém a observação de que são as células da SVZ que dão origem a esses neurônios é indireta. O marcador DCX foi recentemente mostrado marcar progenitores multipotentes (Walker et al., 2007) e portanto não adequado como marcador neuronal. Além disso, uma nova fonte capaz de dar origem a novos neurônios no telencéfalo foi

recentemente descrita por nosso grupo, a zona marginal (Costa et al., 2007). Palmer e colaboradores (1999) ainda mostraram que o estímulo com FGF-2 pode levar células do parênquima cortical a gerar neurônios. Nossos resultados dão sustentação à hipótese de que são os progenitores da SVZ os melhores candidatos a realizar esta re-população parcial.

As populações de progenitores embrionários que geram os dois tipos neuroquímicos, glutamatérgico e GABAérgico, não são separadas apenas fisicamente mas também expressam diferentes repertórios de fatores de transcrição (Schuurmans e Guillemot, 2002). Duas hipóteses podem explicar essa existência em conciliação com os dados da literatura. A primeira seria que existem progenitores capazes de gerar esse tipo celular, mas não o fazem por falta de um gatilho ambiental (progenitores silentes). A segunda hipótese seria a de que os mesmos progenitores que geram neurônios para o BO no período pós-natal, quando na presença de sinais ambientais presentes unicamente no embrião geram neurônios glutamatérgicos (progenitores plásticos). Muitos desses fatores de transcrição expressos durante o desenvolvimento embrionário estão presentes na SVZ pós-natal. A população Emx-1 positiva embrionária, por exemplo, dá origem a neurônios glutamatérgicos, mas não GABAérgicos (Gorski et al., 2002). Na SVZ, no entanto, a linhagem que expressa Emx-1 dá origem a neurônios GABAérgicos do BO (Kohwi et al., 2007). Da mesma forma Pax6 é expresso na VZ dorsal durante o desenvolvimento (Stoykova e Gruss, 1994) e os mutantes que perdem a função dessa proteína possuem uma expansão do campo que gera células GABAérgicas em direção dorsal (Stoykova et al., 2000). Porém na SVZ, Pax6 está envolvido com a diferenciação de uma subpopulação de neuroblastos em neurônios dopaminérgicos (Hack et al., 2005). Assim, a identificação de fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento de neurônios piramidais não se correlaciona com o mesmo destino fenotípico em células da SVZ. Durante o desenvolvimento do sistema

nervoso de diversos animais, os fatores de transcrição do tipo hélice-volta-hélice básico (bHLH) vem se mostrando necessários no desenvolvimento de linhagens neuronais e tem sido chamados de genes pró-neurais (Bertrand et al., 2002). No telencéfalo em desenvolvimento os genes Mash1 e Ngn2 cumprem esse papel de direcionar progenitores para a diferenciação neuronal ventral e dorsal respectivamente (Schuurmans e Guillemot, 2002). A fosforilação de Ngn2 está relacionada com o estabelecimento da morfologia piramidal no córtex cerebral (Hand et al., 2005). A expressão de Ngn2 na SVZ pós-natal nunca foi descrita. Uma possibilidade seria que sinais das fatias embrionárias induzam a expressão desse fator de transcrição.

5.4- Hipótese de trabalho:

Nós estamos propondo aqui um modelo onde os neuroblastos controlam o seu próprio comprometimento com o fenótipo GABAérgico através da sinalização de GABA de putrescina.

Quando estão migrando pela SVZ, os neuroblastos migram em cadeias utilizando uns aos outros como substrato para seu deslocamento (Lois et al., 1996). Nesse ambiente de alta concentração de neuroblastos, GABA proveniente de putrescina estaria em altas concentrações. O reconhecimento de GABA por seus receptores GABA_A leva à inibição da expressão de GAD (Fig.17A). Esta inibição se mantém, portanto, durante todo o trajeto migratório e possivelmente é importante para a migração e proliferação destas células.

Quando atingem o BO, os neuroblastos deixam as cadeias migratórias e passam a migrar independentemente pela camada de células granulares. Assim que deixam as cadeias não só a densidade desses progenitores cai como a concentração de GABA ao seu redor

(passa a ser liberado por sinapses). Essa queda na ativação de GABA_A levaria a liberação da síntese de GAD e estas células entrariam no seu processo de diferenciação e comprometimento GABAérgico (Fig.17B).

A inibição do comprometimento com o fenótipo GABAérgico durante a via migratória leva a susceptibilidade de pelo menos uma subpopulação de neuroblastos da SVZ a sinais ambientais que podem mudar o seu destino fenotípico - plasticidade. Assim, o fenótipo “neurônio glutamatérgico” seria um caminho da paisagem epigenética que nunca é seguido no nicho de origem das células da SVZ por ausência dos gatilhos ambientais adequados.

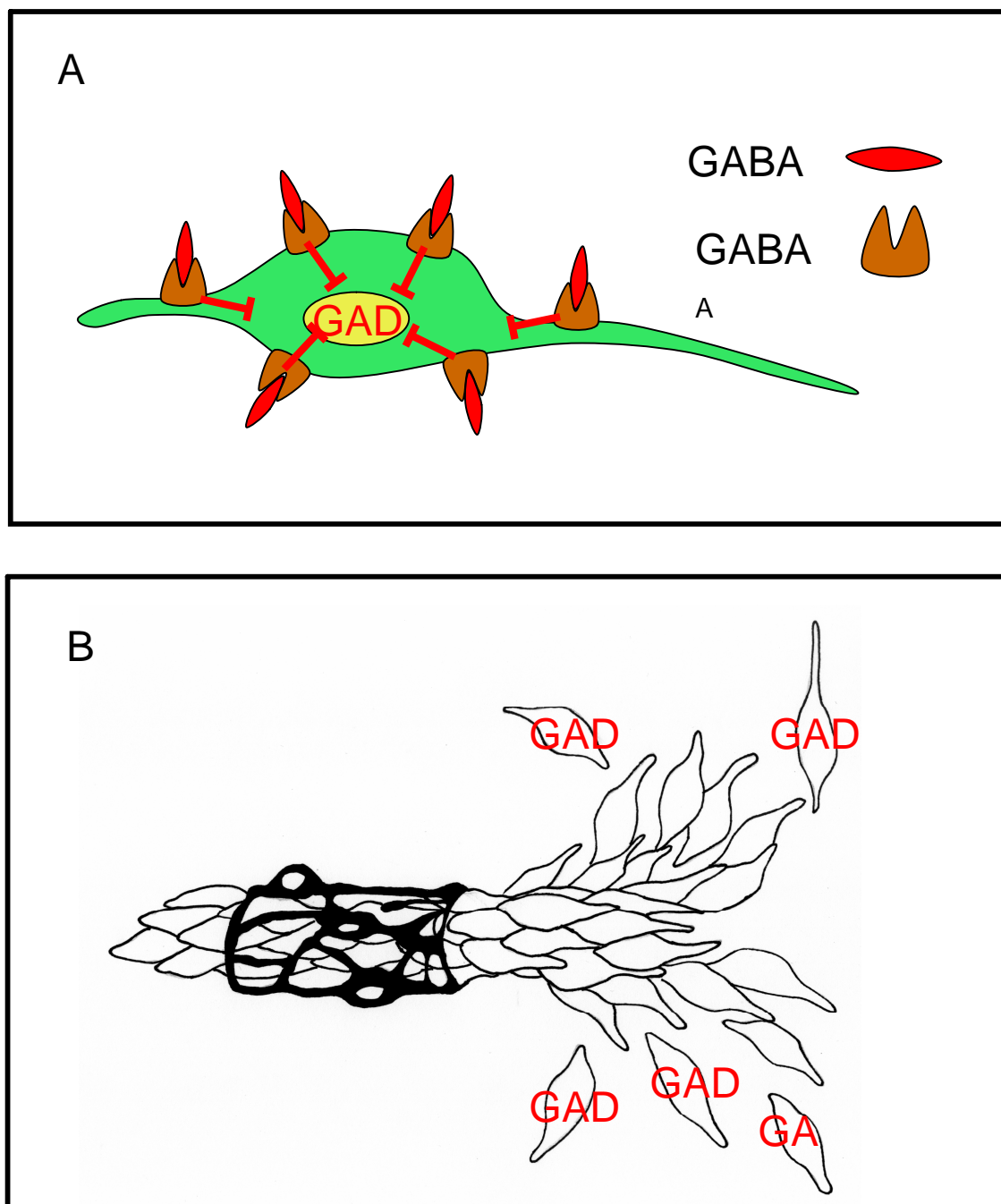


Figura 17. (A) Esquema do modelo experimental onde os neuroblastos recebem a sinalização de GABA proveniente de putrescina que se liga aos seus receptores GABA_A e inibe a síntese de GAD. (B) Essa inibição se mantém ao longo de toda a via migratória onde a densidade de neuroblastos é alta e por consequência a concentração de GABA. Uma vez no BO, os neuroblastos deixam as cadeias e encontram ambientes com concentrações menores de GABA, reduzindo assim a inibição da expressão de GAD. Neste momento estes neuroblastos iniciam seu comprometimento com o fenótipo GABAérgico.

Referências Bibliográficas:

- Alonso, J.R., Arevalo, R., Garcia-Ojeda, E., Porteros, A., Brinon, J.G. & Aijon, J. (1995) NADPH-diaphorase active and calbindin D-28k-immunoreactive neurons and fibers in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J.Comp Neurol.* 351, 307-327.
- Altman, J. & Das, G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J.Comp Neurol.* 124, 319-335.
- Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J.Comp Neurol.* 137, 433-457.
- Alvarez-Buylla, A. & Nottebohm, F. (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 335, 353-354.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M. & Tramontin, A.D. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 287-293.

Alves, J.A., Barone, P., Engelender, S., Froes, M.M. & Menezes, J.R. (2002) Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *J.Neurobiol.* 52, 251-265.

Amundson, R. (2005) *The changing role of the embryo in evolutionary thought: roots of evo-devo*. New York: Cambridge University Press.

Anderson, S.A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D.D., Meneses, J., Pedersen, R. & Rubenstein, J.L. (1997) Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19, 27-37.

Anderson, S.A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K. & Rubenstein, J.L. (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353-363.

Angevine, J.B., Jr. & Sidman, R.L. (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768.

Aungst, J.L., Heyward, P.M., Puche, A.C., Karnup, S.V., Hayar, A., Szabo, G. & Shipley, M.T. (2003) Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*

426, 623-629.

Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D.D., Speh, J.C. & Mandel, G. (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121, 645-657.

Bandeira, F.C.S. (2001) Ontogênese da laminação cortical no hamster. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas (PCM), UFRJ.

Barres, B.A., Koroshetz, W.J., Swartz, K.J., Chun, L.L. & Corey, D.P. (1990) Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 4, 507-524.

Bayer, S.A. (1983) 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp.Brain Res.* 50, 329-340.

Bayer, S.A. (1985) Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 457, 163-172.

Benson, D.L., Huntsman, M.M. & Jones, E.G. (1994) Activity-dependent changes in GAD and preprotachykinin mRNAs in visual cortex of adult monkeys. *Cereb.Cortex* 4,

40-51.

Bertrand, N., Castro, D.S. & Guillemot, F. (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat.Rev.Neurosci.* 3, 517-530.

Betarbet, R., Zigova, T., Bakay, R.A. & Luskin, M.B. (1996) Dopaminergic and GABAergic interneurons of the olfactory bulb are derived from the neonatal subventricular zone. *Int.J.Dev.Neurosci.* 14, 921-930.

Bleier, R. (1971) The relations of ependyma to neurons and capillaries in the hypothalamus: a Golgi-Cox study. *J.Comp Neurol.* 142, 439-463.

Bolteus, A.J. & Bordey, A. (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J.Neurosci.* 24, 7623-7631.

Boulder Committee (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anatomical Record* 166, 257-261.

Borodinsky, L.N., Root, C.M., Cronin, J.A., Sann, S.B., Gu, X. & Spitzer, N.C. (2004) Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in

embryonic neurons. *Nature* 429, 523-530.

Brosenitsch, T.A. & Katz, D.M. (2002) Expression of Phox2 transcription factors and induction of the dopaminergic phenotype in primary sensory neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 20, 447-457.

Bulfone, A., Carotenuto, P., Faedo, A., Aglio, V., Garzia, L., Bello, A.M., Basile, A., Andre, A., Cocchia, M., Guardiola, O., Ballabio, A., Rubenstein, J.L. & Zollo, M. (2005) Telencephalic embryonic subtractive sequences: a unique collection of neurodevelopmental genes. *J. Neurosci.* 25, 7586-7600.

Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P. (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 110-122

Capela, A. & Temple, S. (2002) LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865-875.

Chiasson, B.J., Tropepe, V., Morshead, C.M. & van der, K.D. (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J. Neurosci.* 19,

4462-4471.

Coskun, V., Wu, H., Bianchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J.C., Hutnick, L., Krueger, R.C., Jr., Fan, G., de Vellis, J. & Sun, Y.E. (2008) CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 1026-1031.

Costa, M.R., Kessaris, N., Richardson, W.D., Gotz, M. & Hedin-Pereira, C. (2007) The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex. *J.Neurosci.* 27, 11376-11388.

Crespo, C., Gracia-Llanes, F.J., Blasco-Ibanez, J.M., Gutierrez-Mecinas, M., Marques-Mari, A.I. & Martinez-Guijarro, F.J. (2003) Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neurosci.Lett.* 349, 151-154.

Dahl, D., Crosby, C.J., Sethi, J.S. & Bignami, A. (1985) Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J.Comp Neurol.* 239, 75-88.

- Dawkins, R. (1986) *The blind watchmaker: why the evidence of evolution reveals a universe without design*. New York: W. W. Norton & Company Ltd.
- de Almeida, O.M., Gardino, P.F., Loureiro dos Santos, N.E., Yamasaki, E.N., de Mello, M.C., Hokoc, J.N. & de Mello, F.G. (2002) Opposite roles of GABA and excitatory amino acids on the control of GAD expression in cultured retina cells. *Brain Res.* 925, 89-99.
- del Rio, J.A., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C. & Soriano, E. (1995) Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb.Cortex* 5, 13-21.
- De Marchis, S., Temoney, S., Erdelyi, F., Bovetti, S., Bovolín, P., Szabo, G. & Puche, A.C. (2004) GABAergic phenotypic differentiation of a subpopulation of subventricular derived migrating progenitors. *Eur.J.Neurosci.* 20, 1307-1317.
- De Marchis, S., Bovetti, S., Carletti, B., Hsieh, Y.C., Garzotto, D., Peretto, P., Fasolo, A., Puche, A.C. & Rossi, F. (2007) Generation of distinct types of periglomerular olfactory bulb interneurons during development and in adult mice: implication for intrinsic properties of the subventricular zone progenitor population. *J.Neurosci.* 27,

657-664.

de Mello, F.G., Bachrach, U. & Nirenberg, M. (1976) Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina. *J.Neurochem.* 27, 847-851.

de Mello, F.G. (1984) GABA-mediated control of glutamate decarboxylase (GAD) in cell aggregate culture of chick embryo retina. *Brain Res.* 316, 7-13.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J.Neurosci.* 17, 5046-5061.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 11619-11624.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2002)

EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021-1034.

Eisenstat, D.D., Liu, J.K., Mione, M., Zhong, W., Yu, G., Anderson, S.A., Ghattas, I.,

Puelles, L. & Rubenstein, J.L. (1999) DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J.Comp Neurol.* 414, 217-237.

Ekegren, T. & Gomes-Trolin, C. (2005) Determination of polyamines in human tissues by

precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 338, 179-185.

Emsley, J.G. & Macklis, J.D. (2006) Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-

defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* 2, 175-186.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A., Bulfone, A., Kowalczyk, T. &

Hevner, R.F. (2005) Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex.

J.Neurosci. 25, 247-251.

Esclapez, M., Tillakaratne, N.J., Kaufman, D.L., Tobin, A.J. & Houser, C.R. (1994)

Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J.Neurosci.* 14, 1834-1855.

Fenalti, G., Law, R.H., Buckle, A.M., Langendorf, C., Tuck, K., Rosado, C.J., Faux, N.G., Mahmood, K., Hampe, C.S., Banga, J.P., Wilce, M., Schmidberger, J., Rossjohn, J., El Kabbani, O., Pike, R.N., Smith, A.I., Mackay, I.R., Rowley, M.J. & Whisstock, J.C. (2007) GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 14, 280-286.

Frantz, G.D. & McConnell, S.K. (1996) Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* 17, 55-61.

Furshpan, E.J., MacLeish, P.R., O'Laque, P.H. & Potter, D.D. (1976) Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73, 4225-4229.

Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L.L. & Anderson, D.J. (2003) Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in

vitro. *Neuron* 40, 485-499.

Gage, F.H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.

Gaiano, N., Nye, J.S. & Fishell, G. (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395-404.

Garcia-Verdugo, J.M., Ferron, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E. & Font, E. (2002) The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res.Bull.* 57, 765-775.

Gehring, W.J. & Hiromi, Y. (1986) Homeotic genes and the homeobox. *Annu.Rev.Genet.* 20, 147-173.

Gilbert, S.F. (1991) Epigenetic landscaping: Waddington's use of cell fate bifurcation diagrams. *Biology and Philosophy* 6, 135-154.

Globus, J.H. & Kuhlenbeck, H. (1944) The subependymal cell plate (matrix) and its relationship to brain tumors of the ependymal type. pp. 1-35.

- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J.L. & Jones, K.R. (2002)
Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in
the Emx1-expressing lineage. *J.Neurosci.* 22, 6309-6314.
- Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R.,
Verdugo, J.M., Herrera, D.G. & Vescovi, A.L. (2002) Multipotent neural stem cells
reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J.Neurosci.* 22,
437-445.
- Gunhaga, L., Jessell, T.M. & Edlund, T. (2000) Sonic hedgehog signaling at gastrula stages
specifies ventral telencephalic cells in the chick embryo. *Development* 127, 3283-
3293.
- Gunhaga, L., Marklund, M., Sjödal, M., Hsieh, J.C., Jessell, T.M. & Edlund, T. (2003)
Specification of dorsal telencephalic character by sequential Wnt and FGF
signaling. *Nat.Neurosci.* 6, 701-707.
- Hack, M.A., Sugimori, M., Lundberg, C., Nakafuku, M. & Gotz, M. (2004) Regionalization
and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol.Cell
Neurosci.* 25, 664-678.

- Hack, M.A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P.M. & Gotz, M. (2005) Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat.Neurosci.* 8, 865-872.
- Hanashima, C., Li, S.C., Shen, L., Lai, E. & Fishell, G. (2004) Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science* 303, 56-59.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., Schuurmans, C., Guillemot, F. & Polleux, F. (2005) Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48, 45-62.
- Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L. & Rakic, P. (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J.Neurosci.* 20, 5764-5774.
- Hazzalin, C.A. & Mahadevan, L.C. (2005) Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun. *PLoS.Biol.* 3, e393.
- Hedin-Pereira, C., deMoraes, E.C., Santiago, M.F., Mendez-Otero, R. & Lent, R. (2000) Migrating neurons cross a reelin-rich territory to form an organized tissue out of

embryonic cortical slices. *Eur.J.Neurosci.* 12, 4536-4540.

Hertzberg, T., Brosenitsch, T. & Katz, D.M. (1995) Depolarizing stimuli induce high levels of dopamine synthesis in fetal rat sensory neurons. *Neuroreport* 7, 233-237.

Hevner, R.F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R.A. & Fink, A. (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 141, 39-53.

Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D. & van, H., V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354, 522-525.

Hokoç, J.N.; Ventura, A.L.; Gardino P.F. & de Mello, F.G. (1990) Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. *Brain. Res.* 532,197–202.

Huang, H.S., Matevossian, A., Whittle, C., Kim, S.Y., Schumacher, A., Baker, S.P. & Akbarian, S. (2007) Prefrontal dysfunction in schizophrenia involves mixed-lineage leukemia 1-regulated histone methylation at GABAergic gene promoters.

J.Neurosci. 27, 11254-11262.

Jacob, F.; Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.

J.Mol.Biol. 3, 318-356.

Jacobowitz, D.M. & Winsky, L. (1991) Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J.Comp Neurol.* 304, 198-218.

Jakoby, W.B.; Fredericks, J. (1959) Pyrrolidine and putrescine metabolism: gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 234, 2145-2150.

Jankovski, A. & Sotelo, C. (1996) Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J.Comp Neurol.* 371, 376-396.

Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U. & Frisen, J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.

- Kalman, M. & Pritz, M.B. (2001) Glial fibrillary acidic protein-immunopositive structures in the brain of a Crocodilian, *Caiman crocodilus*, and its bearing on the evolution of astroglia. *J.Comp Neurol.* 431, 460-480.
- Kelsch, W., Mosley, C.P., Lin, C.W. & Lois, C. (2007) Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS.Biol.* 5, e300.
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M. & Richardson, W.D. (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat.Neurosci.* 9, 173-179.
- Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. (1999) Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J.Neurosci.* 19, 2171-2180.
- Kohwi, M., Osumi, N., Rubenstein, J.L. & Alvarez-Buylla, A. (2005) Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J.Neurosci.* 25, 6997-7003.

- Kohwi, M., Petryniak, M.A., Long, J.E., Ekker, M., Obata, K., Yanagawa, Y., Rubenstein, J.L. & Alvarez-Buylla, A. (2007) A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J.Neurosci.* 27, 6878-6891.
- Kondo, T. & Raff, M. (2004) Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes Dev.* 18, 2963-2972.
- Kornberg, R.D. & Thomas, J.O. (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184, 865-868.
- Kosaka, K., Toida, K., Margolis, F.L. & Kosaka, T. (1997) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76, 775-786.
- Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y. & Kosaka, T. (1998) How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci.Res.* 30, 101-110.

- Kosaka, K. & Kosaka, T. (2004) Organization of the main olfactory bulbs of some mammals: musk shrews, moles, hedgehogs, tree shrews, bats, mice, and rats. *J.Comp Neurol.* 472, 1-12.
- Kosaka, K. & Kosaka, T. (2005) synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat.Sci.Int.* 80, 80-90.
- Kosaka, T., Hataguchi, Y., Hama, K., Nagatsu, I. & WU, J.Y. (1985) Coexistence of immunoreactivities for glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in some neurons in the periglomerular region of the rat main olfactory bulb: possible coexistence of gamma-aminobutyric acid (GABA) and dopamine. *Brain Res.* 343, 166-171.
- Kosaka, T., Kosaka, K., Hataguchi, Y., Nagatsu, I., WU, J.Y., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. & Hama, K. (1987) Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp.Brain Res.* 66, 191-210.
- Landis, S.C. & Keefe, D. (1983) Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo: developmental changes in properties of cholinergic sympathetic neurons. *Dev.Biol.*

98, 349-372.

Lariviere, K., MacEachern, L., Greco, V., Majchrzak, G., Chiu, S., Drouin, G. & Trudeau, V.L. (2002) GAD(65) and GAD(67) isoforms of the glutamic acid decarboxylase gene originated before the divergence of cartilaginous fishes. *Mol.Biol.Evol.* 19, 2325-2329.

Laywell, E.D., Kearns, S.M., Zheng, T., Chen, K.A., Deng, J., Chen, H.X., Roper, S.N. & Steindler, D.A. (2005) Neuron-to-astrocyte transition: phenotypic fluidity and the formation of hybrid asters in differentiating neurospheres. *J.Comp Neurol.* 493, 321-333.

Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J.C. & Lledo, P.M. (2005) Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J.Neurosci.* 25, 6816-6825.

Lent, R., Hedin-Pereira, C., Menezes, J.R. & Jhaveri, S. (1990) Neurogenesis and development of callosal and intracortical connections in the hamster. *Neuroscience* 38, 21-37.

- LeVine, S.M. & Goldman, J.E. (1988) Spatial and temporal patterns of oligodendrocyte differentiation in rat cerebrum and cerebellum. *J.Comp Neurol.* 277, 441-455.
- Levison, S.W. & Goldman, J.E. (1993) Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10, 201-212.
- Li, B., Carey, M. & Workman, J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.
- Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat.Rev.Genet.* 3, 662-673.
- Liu, C.J., Grandes, P., Matute, C., Cuenod, M. & Streit, P. (1989) Glutamate-like immunoreactivity revealed in rat olfactory bulb, hippocampus and cerebellum by monoclonal antibody and sensitive staining method. *Histochemistry* 90, 427-445.
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F. & Bordey, A. (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat.Neurosci.*

- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271 , 978-981.
- Lopez-Bendito, G., Lujan, R., Shigemoto, R., Ganter, P., Paulsen, O. & Molnar, Z. (2003) Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb.Cortex* 13, 932-942.
- Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Nacher, J., Ponsoda, X., Sancho-Bielsa, F. & Alonso-Llosa, G. (2002) The lizard cerebral cortex as a model to study neuronal regeneration. *An.Acad.Bras.Cienc.* 74, 85-104.
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B. & Kriegstein, A.R. (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15, 1287-1298.
- Lowe, C.J. & Wray, G.A. (1997) Radical alterations in the roles of homeobox genes during echinoderm evolution. *Nature* 389, 718-721.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Luskin, M.B. (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.

Luskin, M.B. & McDermott, K. (1994) Divergent lineages for oligodendrocytes and astrocytes originating in the neonatal forebrain subventricular zone. *Glia* 11, 211-226.

Magavi, S.S., Leavitt, B.R. & Macklis, J.D. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951-955.

Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. & Gotz, M. (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37, 751-764.

Marin, O. & Rubenstein, J.L. (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 780-790.

- Mayr, E. (1961) Cause and effect in biology. *Science* 134, 1501-1506.
- Mayr, E. (1980) Some thoughts on the history of the evolutionary synthesis. In *Evolutionary synthesis: Perspectives on the unification of biology*, eds. Mayr, E. & Provine, W.B., pp. 1-50. Cambridge: Harvard University Press.
- Menezes, J.R. & Luskin, M.B. (1994) Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J.Neurosci.* 14, 5399-5416.
- Menezes, J.R., Smith, C.M., Nelson, K.C. & Luskin, M.B. (1995) The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol.Cell Neurosci.* 6, 496-508.
- Menezes, J.R., Dias, F., Garson, A.V. & Lent, R. (1998) Restricted distribution of S-phase cells in the anterior subventricular zone of the postnatal mouse forebrain. *Anat.Embryol.(Berl)* 198 , 205-211.
- Menezes, J.R., Marins, M., Alves, J.A., Froes, M.M. & Hedin-Pereira, C. (2002) Cell migration in the postnatal subventricular zone. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 35, 1411-1421.

- Mercier, F., Kitasako, J.T. & Hatton, G.I. (2002) Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J.Comp Neurol.* 451, 170-188.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 17528-17532.
- Merkle, F.T., Mirzadeh, Z. & Alvarez-Buylla, A. (2007) Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381-384.
- Miller, M. & Peters, A. (1981) Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J.Comp Neurol.* 203, 555-573.
- Millhouse, O.E. (1971) A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.* 121, 1-13.
- Miyakoshi, L.M., Mendez-Otero, R. & Hedin-Pereira, C. (2001) The 9-O-acetyl GD3 gangliosides are expressed by migrating chains of subventricular zone neurons in vitro. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 34, 669-673.

- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T. & Ogawa, M. (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133-3145.
- Mizutani, K. & Saito, T. (2005) Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* 132, 1295-1304.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R. & Macklis, J.D. (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.* 8, 427-437.
- Momma, S., Johansson, C.B. & Frisen, J. (2000) Get to know your stem cells. *Curr.Opin.Neurobiol.* 10, 45-49.
- Mori, K., Kishi, K. & Ojima, H. (1983) Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J.Comp Neurol.* 219, 339-355.
- Morrison, L.D., Becker, L., Ang, L.C. & Kish, S.J. (1995) Polyamines in human brain: regional distribution and influence of aging. *J.Neurochem.* 65, 636-642.

Mugnaini, E., Wouterlood, F.G., Dahl, A.L. & Oertel, W.H. (1984) Immunocytochemical identification of GABAergic neurons in the main olfactory bulb of the rat.

Arch.Ital.Biol. 122, 83-113.

Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.

Muller, H.J. (1930) Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J.Genet.* 22, 299-334. apud, Elgin, S.C.R.; Reuter, G. (2007) Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*, em Allis, C.D.; Jenuwein, T.; Reinberg, D.; Caparros, M-L, Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Muzio, L. & Mallamaci, A. (2005) Foxg1 confines Cajal-Retzius neuronogenesis and hippocampal morphogenesis to the dorsomedial pallium. *J.Neurosci.*, **25**, 4435-4441.

Nawa, H. & Patterson, P.H. (1990) Separation and partial characterization of neuropeptide-inducing factors in heart cell conditioned medium. *Neuron* 4, 269-277.

- Nguyen, L., Malgrange, B., Breuskin, I., Bettendorff, L., Moonen, G., Belachew, S. & Rigo, J.M. (2003) Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J.Neurosci.* 23, 3278-3294.
- Nieto, M., Monuki, E.S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S.J., Cunningham, J., Gotz, M. & Walsh, C.A. (2004) Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J.Comp Neurol.* 479, 168-180.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S. & Kriegstein, A.R. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. & Kriegstein, A.R. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat.Neurosci.* 7, 136-144.
- Oertel, W.H., Schmechel, D.E., Brownstein, M.J., Tappaz, M.L., Ransom, D.H. & Kopin, I.J. (1981) Decrease of glutamate decarboxylase (GAD)-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra after kainic acid lesion of the striatum.

J.Histochem.Cytochem. 29, 977-980.

Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. & Nishimune, Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313-319.

Orona, E., Scott, J.W. & Rainer, E.C. (1983) Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb. *J.Comp Neurol.* 217, 227-237.

Palmer, T.D.; Takahashi, J. & Gage, F.H. (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 389-404.

Palmer, T.D., Markakis, E.A., Willhoite, A.R., Safar, F. & Gage, F.H. (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J.Neurosci.* 19, 8487-8497.

Panzanelli, P., Fritschy, J.M., Yanagawa, Y., Obata, K. & Sassoe-Pognetto, M. (2007) GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. *J.Comp Neurol.* 502, 990-1002.

Parrish-Aungst, S., Shipley, M.T., Erdelyi, F., Szabo, G. & Puche, A.C. (2007) Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J.Comp Neurol.* 501,

825-836.

Pencea, V. & Luskin, M.B. (2003) Prenatal development of the rodent rostral migratory stream. *J.Comp Neurol.* 463, 402-418.

Peters, A. & Kara, D.A. (1985) The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cells. *J.Comp Neurol.* 234, 218-241.

Pinching, A.J. & Powell, T.P. (1971) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J.Cell Sci.* 9, 305-345.

Pinching, A.J. & Powell, T.P. (1972) The termination of centrifugal fibres in the glomerular layer of the olfactory bulb. *J.Cell Sci.* 10, 621-635.

Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T. & Ghosh, A. (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129, 3147-3160.

Porter, J., Anand, T., Johnson, B., Khan, R.M. & Sobel, N. (2005) Brain mechanisms for extracting spatial information from smell. *Neuron* 47, 581-592.

Privat, A. (1975) Postnatal gliogenesis in the mammalian brain. *Int.Rev.Cytol.* 40, 281-323.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A. & Temple, S. (2000)
Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell
production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69-80.

Raedler, E. & Raedler, A. (1978) Autoradiographic study of early neurogenesis in rat
neocortex. *Anat.Embryol.(Berl)* 154, 267-284.

Ramirez-Castillejo, C., Nacher, J., Molowny, A., Ponsoda, X. & Lopez-Garcia, C. (2002)
PSA-NCAM immunocytochemistry in the cerebral cortex and other telencephalic
areas of the lizard *Podarcis hispanica*: differential expression during medial cortex
neuronal regeneration. *J.Comp Neurol.* 453, 145-156.

Ramirez, C., Nacher, J., Molowny, A., Sanchez-Sanchez, F., Irurzun, A. & Lopez-Garcia,
C. (1997) Photoperiod-temperature and neuroblast proliferation-migration in the
adult lizard cortex. *Neuroreport* 8, 2337-2342.

Rakic, P. (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time
of origin and eventual disposition. *Science* 183, 425-427.

Reynolds, B. A. & Rietze, R. L. (2005) Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat.Methods*, 2, 333-336.

Reynolds, B.A., Tetzlaff, W. & Weiss, S. (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J.Neurosci.* 12, 4565-4574.

Ribak, C.E., Vaughn, J.E., Saito, K., Barber, R. & Roberts, E. (1977) Glutamate decarboxylase localization in neurons of the olfactory bulb. *Brain Res.* 126, 1-18.

Rimvall, K. & Martin, D.L. (1992) Increased intracellular gamma-aminobutyric acid selectively lowers the level of the larger of two glutamate decarboxylase proteins in cultured GABAergic neurons from rat cerebral cortex. *J.Neurochem.* 58, 158-166.

Rimvall, K., Sheikh, S.N. & Martin, D.L. (1993) Effects of increased gamma-aminobutyric acid levels on GAD67 protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. *J.Neurochem.* 60, 714-720.

Romero-Aleman, M.M., Monzon-Mayor, M., Yanes, C. & Lang, D. (2004) Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to

successful structural repair in the cerebral cortex of the lizard *Gallotia galloti*.
Exp.Neurol. 188, 74-85.

Saino-Saito, S., Sasaki, H., Volpe, B.T., Kobayashi, K., Berlin, R. & Baker, H. (2004)
Differentiation of the dopaminergic phenotype in the olfactory system of neonatal
and adult mice. *J.Comp Neurol.* 479, 389-398.

Sauer, F.C. (1935) Mitosis in the neural tube. *J.Comp Neurol.* 62, 377-407.

Schmechel, D.E. & Rakic, P. (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing
monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes.
Anat.Embryol.(Berl) 156, 115-152.

Schoenherr, C.J., Paquette, A.J. & Anderson, D.J. (1996) Identification of potential target
genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 9881-
9886.

Schubert, M., Yu, J.K., Holland, N.D., Escriva, H., Laudet, V. & Holland, L.Z. (2005)
Retinoic acid signaling acts via Hox1 to establish the posterior limit of the pharynx
in the chordate amphioxus. *Development* 132, 61-73.

- Schuermans, C. & Guillemot, F. (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr.Opin.Neurobiol.* 12, 26-34.
- Seiler, N. & Al Therib, M.J. (1974) Putrescine catabolism in mammalian brain. *Biochem.J.* 144, 29-35.
- Seiler, N. (2004) Catabolism of polyamines. *Amino.Acids* 26, 217-233.
- Sequerria, E.B., Froes, M.M., Menezes, J.R.L. & Hedin-Pereira, C. (2003) Embryonic signals trigger changes in postnatal SVZ migratory behaviour and give rise to multiple cell types.
- Sequerria, E.B., Carvalho, L.L., Fróes, M.M., Menezes, J.R.L., Gardino, P.F., de Mello, F.G. & Hedin-Pereira, C. (2006) Postnatal subventricular zone cells can differentiate into glutamatergic neurons: a plasticity mechanism involving GABA synthesis without GABAergic commitment?. p. 01.054.
- Sequerria, E.B., Gardino, P., Hedin-Pereira, C. & de Mello, F.G. (2007) Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. *Neuroscience* 146, 489-493.

- Shepherd, G.M. & Greer, C.A. (1990) Olfactory bulb. In *The synaptic organization of the brain*, ed. Shepherd, G.M., pp. 159-204. New York: Oxford University Press.
- Shimada, M. & Langman, J. (1970) Cell proliferation, migration and differentiation in the cerebral cortex of the golden hamster. *J.Comp Neurol.* 139, 227-244.
- Shipley, M.T., Ennis, M. & Puche, A. (2004) Olfactory system. In *The rat nervous system*, ed. Paxinos, G., pp. 922-963. Elsevier.
- Sidman, R.L. & Rakic, P. (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 62, 1-35.
- Smart, I.H. (1973) Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J.Anat.* 116, 67-91.
- Smart, I.H. & McSherry, G.M. (1982) Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J.Anat.* 134, 415-442.

- Smart, I.H. & Smart, M. (1982) Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon: I. Autoradiographic studies of the histogenesis of the isocortex and adjacent areas. *J.Anat.* 134, 273-298.
- Smart, I.H., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M. & Kennedy, H. (2002) Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb.Cortex* 12, 37-53.
- Smith, C.M. & Luskin, M.B. (1998) Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Dev.Dyn.* 213, 220-227.
- Sobue, K. & Nakajima, T. (1974) Metabolism of putrescine in neuroblastoma nad glioma cells during culture. *J. Biochem.* 82, 1121-1126.
- Song, M.R. & Ghosh, A. (2004) FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat.Neurosci.* 7, 229-235.
- Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial

glial cells during embryogenesis. *J.Neurosci.* 25, 10-18.

Stanke, M., Duong, C.V., Pape, M., Geissen, M., Burbach, G., Deller, T., Gascan, H., Parlato, R., Schutz, G. & Rohrer, H. (2006) Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp 130 signaling. *Development* 133, 141-150.

Stenman, J., Toresson, H. & Campbell, K. (2003) Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J.Neurosci.* 23, 167-174.

Stewart, R.R., Hoge, G.J., Zigova, T. & Luskin, M.B. (2002) Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *J.Neurobiol.* 50, 305-322.

Stoykova, A. & Gruss, P. (1994) Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J.Neurosci.* 14, 1395-1412.

Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M. & Gruss, P. (2000) Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J.Neurosci.* 20, 8042-

8050.

Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Stuhmer, T., Anderson, S.A., Ekker, M. & Rubenstein, J.L. (2002) Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* 129, 245-252.

Suzuki, S.O. & Goldman, J.E. (2003) Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J.Neurosci.* 23, 4240-4250.

Takahashi, T.; Nowakowski, R.S.; Caviness Jr., V.S. (1995) Early Ontogeny of the Secondary Proliferative Population of the Embryonic Murine Cerebral Wall. *J.Neurosci.* 15, 6058-6068.

Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M. & Taga, T. (2001) DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev.Cell* 1, 749-758.

- Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K. & Kaneko, T. (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J.Comp Neurol.* 467, 60-79.
- Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N. & Gruss, P. (2001) Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development* 128, 1983-1993.
- Toida, K., Kosaka, K., Heizmann, C.W. & Kosaka, T. (1998) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J.Comp Neurol.* 392, 179-198.
- Toresson, H., Potter, S.S. & Campbell, K. (2000) Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development* 127, 4361-4371.
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T. & Hisatsune, T. (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47, 803-815.

Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., Lim, D.A. & Alvarez-Buylla, A. (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb.Cortex* 13, 580-587.

Turner, B.M. (2007) Defining an epigenetic code. *Nat.Cell Biol.* 9, 2-6.

Ventura, R.E. & Goldman, J.E. (2007) Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *J.Neurosci.* 27, 4297-4302.

Vergano-Vera, E., Yusta-Boyo, M.J., de Castro, F., Bernad, A., de Pablo, F. & Vicario-Abejon, C. (2006) Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. *Development* 133, 4367-4379.

Voigt, T. (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J.Comp Neurol.* 289, 74-88.

Waddington, C.H. (1939) *Introduction to modern genetics*. Londres: G. Allen & Unwin Ltd.

- Waddington, C.H. (1942) Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150, 563-565.
- Waddington, C.H. (1953) Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution* 7, 118-126.
- Waddington, C.H. (1957) *The Strategy of the Genes*. Londres: Geo Allen & Unwin.
- Walicke, P.A., Campenot, R.B. & Patterson, P.H. (1977) Determination of transmitter function by neuronal activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 5767-5771.
- Walicke, P.A. & Patterson, P.H. (1981) On the role of Ca²⁺ in the transmitter choice made by cultured sympathetic neurons. *J.Neurosci.* 1, 343-350.
- Walker, T.L., Yasuda, T., Adams, D.J. & Bartlett, P.F. (2007) The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells. *J.Neurosci.* 27, 3734-3742.
- Wang, D.D., Krueger, D.D. & Bordey, A. (2003) GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABA_A receptor activation. *J.Physiol* 550,

785-800.

- Wang, Y., Sheen, V.L. & Macklis, J.D. (1998) Cortical interneurons upregulate neurotrophins in vivo in response to targeted apoptotic degeneration of neighboring pyramidal neurons. *Exp.Neurol.* 154, 389-402.
- Watt, S.D., Gu, X., Smith, R.D. & Spitzer, N.C. (2000) Specific frequencies of spontaneous Ca²⁺ transients upregulate GAD 67 transcripts in embryonic spinal neurons. *Mol.Cell Neurosci.* 16, 376-387.
- Weinmaster, G., Roberts, V.J. & Lemke, G. (1992) Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116, 931-941.
- Weruaga, E., Brinon, J.G., Porteros, A., Arevalo, R., Aijon, J. & Alonso, J.R. (2000) Expression of neuronal nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase during olfactory deafferentation and regeneration. *Eur.J.Neurosci.* 12, 1177-1193.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, 779-791.

- Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G. & Alvarez-Buylla, A. (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128, 3759-3771.
- Wolffe, A.P. & Matzke, M.A. (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286, 481-486.
- Xu, Q., de la, C.E. & Anderson, S.A. (2003) Cortical interneuron fate determination: diverse sources for distinct subtypes? *Cereb.Cortex* 13, 670-676.
- Yun, K., Potter, S. & Rubenstein, J.L. (2001) Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128, 193-205.
- Zhang, Y. & Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343-2360.
- Zimmer, C., Tiveron, M.C., Bodmer, R. & Cremer, H. (2004) Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper

cortical layer neurons. *Cereb.Cortex* 14, 1408-1420.

Zupanc, G.K. & Clint, S.C. (2001) Radial glia-mediated up-regulation of somatostatin in the regenerating adult fish brain. *Neurosci.Lett.* 309, 149-152.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)